Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Straub

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE POST MORTEM ENTSTEHENDEN VERÄNDERUNGEN DER METABOLITE GLUKOSE, FRUKTOSE UND GLYKOGEN IN DEN VORDEREN AUGENABSCHNITTEN VON RINDERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GERLINDE KRIETT, geb. Meiner
aus Jahnsbach

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Straub

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE POST MORTEM ENTSTEHENDEN VERÄNDERUNGEN DER METABOLITE GLUKOSE, FRUKTOSE UND GLYKOGEN IN DEN VORDEREN AUGENABSCHNITTEN VON RINDERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GERLINDE KRIETT, geb. Meiner
aus Jahnsbach

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 3. März 1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin

Dekan : Prof. Dr. med. F. Neurath

Referent : Prof. Dr. med. M. Reim

Korreferent : Prof. Dr. med. L. Welge-Lüssen

INHALT

A. Einleitung 1

I. Anatomie und Histologie der Hornhaut 1

a. Epithel 1
b. Bowman'sche Membran 2
c. Stroma 2
d. Descemet'sche Membran 2
e. Endothel 3

II. Biochemie und Physiologie der Hornhaut 3

III. Bedeutung und Zusammensetzung des Kammerwassers 6

IV. Biochemie der Glukose, der Fruktose und des Glykogens 7

a. Glukose 7
b. Fruktose 9

1. Vorkommen der Fruktose 9
2. Stoffwechselwege der Fruktose 11

c. Glykogen 14

1. Vorkommen des Glykogens 14
2. Aufbau des Glykogenmoleküls 16
3. Stoffwechselwege des Glykogens 18

V. Fragestellung 20

B. Material und Methodik 21

I. Materialgewinnung und Lagerungsbedingungen 21
II. Aufbereitung von Gewebe und Kammerwasser 22
III. Extraktgewinnung 23

a. Extraktgewinnung zur kombinierten Bestimmung von Glukose und Fruktose im Epithel 23

b. Extraktgewinnung zur Glykogenbestimmung im Epithel 24

c. Extraktgewinnung zur kombinierten Bestimmung von Glukose und Fruktose im Kammerwasser 25

IV. Quantitative Analyse 25

V. Testansätze 27

VI. Berechnung der Ergebnisse 28

VII. Statistische Auswertung 29

C. Ergebnisse 30

I. Makroskopische Veränderung der gelagerten Hornhäute 30

II. Ergebnisse der enzymatischen Bestimmung von Glukose in Epithel und Kammerwasser 30

III. Ergebnisse der enzymatischen Bestimmung von Fruktose in Epithel und Kammerwasser 34

IV. Ergebnisse der enzymatischen Bestimmung des Glykogens im Epithel 41

D. Diskussion 43

I. Glukose 43

II. Fruktose 46

III. Glykogen 48

E. Zusammenfassung 53

F. Literaturverzeichnis 55

Anhang 71

A. Einleitung

Hornhaut und Linse stellen zusammen als brechende Medien das bildentwerfende Organ des Auges. Die Transparenz der Hornhaut, gleichbleibende Dicke und Krümmung müssen jedoch für diese Anforderung gewährleistet sein. Als besonders festes Bindegewebe hält sie dem Augeninnendruck stand und bietet außerdem Schutz vor mechanischen und chemischen Irritationen der Umwelt.

I. Anatomie und Histologie der Hornhaut

Histologisch setzt sich die Hornhaut aus drei Schichten zusammen: Epithel, Stroma und Endothel. Die Bowman'sche und Descemet'sche Membran sind als sogenannte Glashäute dazwischen geschaltet.

a. Epithel

Das Epithel der Cornea ist ein unverhorntes mehrschichtiges Plattenepithel, das morphologisch bei fast allen Spezies identisch ist. Lediglich die Zahl der Zellagen und die Dicke können variieren. So besteht das menschliche Epithel aus 7-8 Zellagen bei einer Dicke von 32 µ, während sich das Rinderepithel aus 9-11 Zellagen zusammensetzt und 100 µ dick ist. (Calmettes, Deodati, Planel und Bec 1956).

Lichtmikroskopisch unterscheidet man Basal-, Intermediär- und Superficialzellen. Der Übergang von den kubisch bis zylindrische Basalzellen über die runden Intermediär- oder Flügelzellen zu den Deckzellen ist fließend. (Hanna, O'Brian 1960).

Als sogenanntes Stratum germinativum sind die Basalzellen, die einer eigenen Membran aufsitzen, deutlich strukturiert mit kontrastreichem Kern und gut ausgebildeten Zellorganellen.

Elektronenmikroskopisch lassen sich Endoplasmatisches Retikulum, ein gut entwickelter Golgiapparat, jedoch nur wenig Mitochondrien mit mäßig ausgebildeten Cristae unterscheiden (Rohen 1964).
Untereinander sind die Zellen durch Desmosomen verbunden; auch die Deckzellen besitzen feinste cytoplasmatische Ausläufer, die für das Haften des Tränenfilms verantwortlich sind (Jakus 1961, Pedler 1967, Aono 1961).
Besonders der untere Pol der Basalzellen weist ein reiches Glykogenlager auf, während an dieser Stelle bei Intermediär- und Superficialzellen nur wenige Glykogenkörner vorkommen (Calmettes, Deodati, Planel und Bec 1957).

b. Bowman'sche Membran

Die Bowman'sche Membran wird als kondensierte oberste Stromaschicht angesehen, die zellfrei und trotz ihres homogenen Erscheinens von feinen Fibrillen durchzogen ist (Redslob 1935, Busacca 1952). Charakteristischerweise ist sie nur bei Primaten ausgebildet.

c. Stroma

Das Hornhautstroma besteht aus Lamellen, in denen kollagene Fibrillenbündel sich in konstanten Winkeln kreuzen, so daß ein regelmäßiges Muster entsteht (Rohen). Eingebettet sind die Fibrillen in eine Mukopolysaccharidschicht, die für die Quellung des Corneastromas bei Ausbildung eines Ödems verantwortlich ist. Die Stromazellen, auch Keratozyten genannt, sind nur mit 10% am gesamten Gewebsvolumen beteiligt (Kaye 1969).

d. Descemet'sche Membran

Die hintere Glasmembran wird nach Rohen als hypertrophierte Basalmembran des Endothels angesehen. Dank ihrer lamellärfibrillären Struktur, die im Elektronenmikroskop als regelmäßiges hexogonales Gitter imponiert (Jakus), be-

sitzt sie eine große mechanische Widerstandskraft. Wenn durch Krankheit die übrige Hornhaut zugrunde gegangen ist, bleibt sie oft allein erhalten und verhindert ein Abfließen der Vorderkammer (Engelking, Leydhecker).

e. Endothel

Das Endothel sitzt als einzellige polygonale Schicht der Descemet'schen Membran auf. Im Gegensatz zu den Epithelzellen besitzt es reichhaltige und gut ausgebildete Organellen : Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat. Staubesand 1962 und Jakus 1961 konnten elektronenmikroskopisch einen aktiven Transport gelöster Stoffe durch Membranvesikulation nachweisen.

II. Biochemie und Physiologie der Hornhaut

Voraussetzung für die Transparenz der Cornea ist neben einem intakten Epithel- und Endothelverband ein ausreichender Energiestoffwechsel. Bei Läsion oder Erkrankung des oberflächlichen Zellverbandes, bei Sauerstoffmangel sowie Mangel an nutritiven Metaboliten kommt es zur Einlagerung von Wasser in das Hornhautparenchym, was durch Lichtstreuung eine diffuse Trübung zur Folge hat. Elektronenmikroskopisch sieht man dann lakunenartig erweiterte Interzellularspalten und intrazelluläre Vakuolen (Rohen). Die Fibrillen des Stromas verlieren durch Quellung der Mukopolysaccaride ihre regelmäßige Anordnung, die interfibrillären Räume vergrößern sich und drängen die Stromalamellen auseinander (Jakus 1964). Verantwortlich für das Quellungsvermögen der Hornhaut sind die Glykosaminoglykane der Grundsubstanz, die als Makromoleküle netzartig im interfibrillären Raum angeordnet sind und sich durch ihre Schwefelsäure- und Acetylaminogruppen wie große negativ geladene Ionen verhalten.

Die physiologisch transparente Cornea findet sich ständig in einem Zustand der Dehydratation, dabei üben die Glykosaminoglykane einen Sog aus, der das Parenchym komprimiert und in sich stabilisiert. Dieser negative Druck, auch Imbibitionsdruck genannt (Hedbys, Mishima, Maurice 1963), entspricht dem von Maurice auf physikalische Weise ermittelten reziproken Quellungsdruck von 60 mmHg.

Es wird verständlich, daß dieser Zustand der permanenten Entquellung eine aktive Stoffwechselleistung ist. Folglich trübt sich die Hornhaut bei Inkubation mit Stoffwechselgiften wie z.B. Strophantin oder bei Verlangsamung der enzymatischen Aktivität durch Kälte. Davson, Harris und Nordquist (1955) brachten den Nachweis, daß sich die Cornea bei Lagerung unter + 10^{o} Celsius durch Quellung trübt, das Ödem sich jedoch bei Wiedererwärmung auf Zimmertemperatur zurückbildet. Dieses Phänomen wird temperature reversal Effekt genannt. Für diesen aktiven Wassertransport, dessen Leistung dem Endothel zugeschrieben wird, muß ausreichend Sauerstoff zur Verfügung stehen.

1953 beschrieben Smelser und Ozeanics ein Hornhautödem unter harten Kontaktlinsen bedingt durch O_2-Mangel. Reim und Meyer sowie Reim und Lichte wiesen 1967 eine direkte Abhängigkeit des Corneaödems einerseits von der Sauerstoffversorgung, andererseits vom Energiestoffwechsel nach. So kommen für die Cornea hauptsächlich zwei Sauerstoffquellen in Frage: die luftgesättigte Tränenflüssigkeit und der im Kammerwasser gelöste Sauerstoff. 80% des für die Oxidationsprozesse benötigten Sauerstoffs werden vom Epithel über die Tränenflüssigkeit aufgenommen, während 20% durch Diffusion aus dem Kammerwasser stammt, das den gleichen Sauerstoffpartialdruck wie das Blut aufweist (Langham 1952, Smelser 1952, Riley 1969).
Bei geschlossenen Lidern wird durch Diffusion aus den Bindehautgefäßen noch ein Sauerstoffpartialdruck von 55 mmHg ermöglicht (Hill und Fatt 1963, Takashi u.Fatt 1965).

Die kritische Sauerstoffspannung, bei der sich ein Corneaödem entwickelt, liegt nach Polse und Mandell (1970) unterhalb von 11 - 19 mmHg.

Durch das Fehlen von Blutgefäßen nimmt die Hornhaut bezüglich der Ernährung und auch immunbiologisch eine Sonderstellung ein. Theoretisch kommen für die Versorgung mit nutritiven Metaboliten wieder mehrere Wege in Frage, nämlich Tränenflüssigkeit, Randschlingennetz der Conjunktiva und Kammerwasser. Reim, Lax, Lichte und Turss (1967) verglichen den Glukosegehalt von Tränenflüssigkeit, Cornea und Kammerwasser. Dadurch ist bekannt, daß der Glukosespiegel in den Tränen 20 mal niedriger ist als der des Corneaparenchyms. Außerdem scheint diese Ernährungsquelle über die eng verzahnten Epithelzellen schon wegen des großen Diffusionswiderstandes für Glukose nicht in Betracht zu kommen. Eine maßgebliche Beteiligung der Limbusgefäße bestreitet Maurice (1967) auf Grund physikalischer Berechnungen der Diffusionsgrößen innerhalb der Hornhaut. So müßte ein Glukosemolekül aus den Limbusgefäßen zu den vorderen Hornhautabschnitten einen 15 mal längeren Weg zurücklegen als aus dem Kammerwasser. Nach den Berechnungen von Maurice (1967), stammen 13% des Glukoseanteils aus den Gefäßen des Randschlingennetzes, die eine paralimbale 1 mm breite Zone versorgen. Schütte und Reim (1973) konnten keinen signifikanten Unterschied der Glukosekonzentration zwischen Peripherie und Zentrum feststellen. Bei Implantation einer intralamellären Kunststoffmembran (Turss, Friend, Dohlman 1970) oder Auffüllen der Vorderkammer mit Luft oder Silikonöl (Reim, Schütte, Cattepoel 1971) wurde der Nachschub der nutritiven Metabolite aus dem Kammerwasser unterbunden, und es konnte bewiesen werden, daß die Limbusgefäße die Hornhauternährung nicht aufrechterhalten können.

Dem Konzentrationsgefälle Kammerwasser- Stroma folgend diffundiert die Glukose zum Hornhautepithel, und in entgegengesetzter Richtung wird das Laktat als Abbauprodukt des glykolytischen Stoffwechsels eliminiert (Reim, Cattepoel, Bittman und Kilp 1969).
Das Endothel bildet mit seinem lockeren Zellverband keine nennenswerte Permeabilitätsschranke für Glukose.
Hale und Maurice (1969) berichteten, daß der Eintritt von Glukosemolekülen rascher erfolgt, als man bei der Molekülgröße erwartet, und daß trotz des eigenen Glukoseverbrauchs der Metabolitspiegel des Stromas hoch bleibt.
Auf Grund dieser Erkenntnisse schließt man auf einen durch aktive Leistung beschleunigten Transport der Glukosemoleküle, wahrscheinlich gekoppelt an die Ionenpumpe, deren Bestehen für jede Zelle postuliert wird.

Es wird auch ein Trägerprotein diskutiert, welches das Glukosemolekül durch die Endothelzelle schleusen soll.
Hodson 1971 und Barber 1972 berichteten von der Existenz eines solchen Proteinkomplexes und seiner möglichen Carrierfunktion.

III. Bedeutung und Zusammensetzung des Kammerwassers

Das Kammerwasser wird durch Sekretion und Ultrafiltration vom Ziliarepithel gebildet, ist für den An- und Abtransport nutritiver Metabolite und ihrer Abbauprodukte für Hornhaut und tiefer gelegene Augengewebe verantwortlich und fließt über den Schlemm'schen Kanal wieder ab.
In seiner Zusammensetzung unterscheidet es sich vom Blutplasma durch Glukose-, Fruktose-, Ascorbinsäure- und Bicarbonatgehalt.

Die treibende Kraft für den Kammerwasserstrom ist ein hydrostatisches Druckgefälle sowie thermodynamisches Zirkulieren, da das Kammerwasser und darin enthaltene Zellen an der Hornhautinnenfläche durch Abkühlen herabsinken, um durch Erwärmen an der Iris wieder emporzusteigen.

IV. Biochemie der Glukose, Fruktose und des Glykogens

a. Glukose

Wie fast alle Körperzellen so nutzt auch das Corneaepithel Glukose als unmittelbare Quelle zur Energiegewinnung. Es sind zwei Stoffwechselwege zu nennen, die diese Energie für das Corneaepithel verfügbar machen: Die Glykolyse d.h. der anaerobe Abbau zur Brenztrauben- und Milchsäure und weiter die aerobe Oxidation von Pyruvat im Zitronensäurezyklus.

Kinoshita und Masurat (1954) zeigten nun, daß im Corneaepithel und besonders in der Linse die direkte Glukoseoxydation über den Pentosephosphatshunt eine wichtige Rolle spielt. Durch Inkubieren radioaktiv markierter 1-C^{14} Glukose und 6-C^{14} Glukose konnte die Beteiligung der Reaktionswege quantitativ erfaßt werden. Da C-1 Glukose im Hexosemonophosphatshunt bevorzugt oxidiert wird, ermittelten Kinoshita, Masurat und Helfant (1955), daß 65% der Glukose über die Glykolyse und 35 % durch den direkten Pentosephosphatshunt metabolisiert werden.

Kuhlman und Resnik (1959) berichten sogar von 70%, die in der Kaninchencornea über den HMP-Shunt laufen.

Die wichtigste Aufgabe des Pentosephosphatzyklus scheint in der Bildung von NADP-H zu liegen, das als reduzierendes Agens bei vielen biologischen Syntheseschritten notwendig ist.

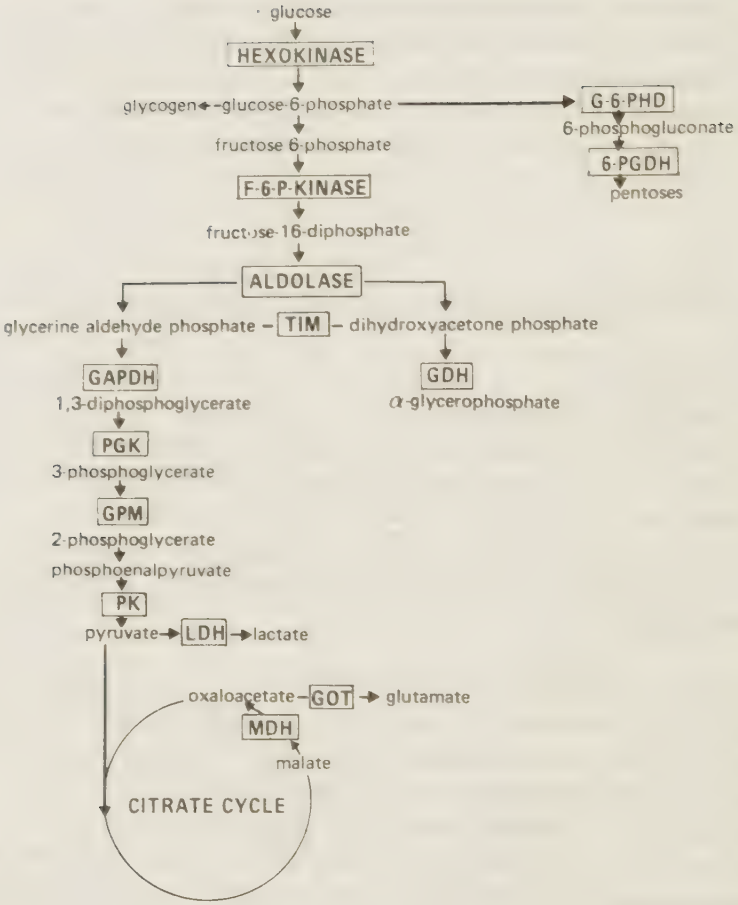

Abb. 1 Vereinfachtes Stoffwechselschema der Glukose

Erläuterung zur Abb. 1

HK	=	Hexokinase
ALD	=	Fruktose-1-6-diphosphat-Aldolase
GAPDH	=	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
PGH	=	3-Phosphoglycerat-Kinase
PK	=	Pyruvat-Kinase
MDH	=	Malat-Dehydrogenase
G-6-PDH	=	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
GDH	=	Glycerin-1-phosphat-Dehydrogenase
LDH	=	Laktat-Dehydrogenase
TIM	=	Triosephosphat-Isomerase

b. Fruktose

1. Vorkommen der Fruktose

Die Fruktose (Lävulose) ist im Pflanzenreich weitverbreitet, wird jedoch im tierischen Organismus nur von wenigen Geweben gebildet.

Im normalen Blut sind nur Spuren von Fruktose vorhanden. Auch nach Fruktosebelastung steigt die Konzentration im Blut nie auf hohe Werte an. Sie bleibt bei oraler Zufuhr in der Regel unter 10 mg/100 ml, während sie nach intravenöser Injektion Werte von 50-100 mg/100 ml erreicht. Der Fruktosespiegel sinkt jedoch rasch wieder ab (Leuthardt und Stuhlfauth 1960).

Die Fruktose kann aber auch im Tierkörper selbst gebildet werden. So kommt freie Fruktose in den Geweben der Samenbläschen und in der Placenta vor. Ihre Zellen sind durch das spezielle Enzymsystem befähigt, es aus der Glukose zu bilden (Hers 1956, 1957, 1960).

Die synthetisierte Fruktose wird dann von den Samenbläschen in ihr Sekret die Samenflüssigkeit und von der Placenta in den fetalen Blutkreislauf abgegeben.

Hubbard und Russel (1937) fanden Fruktose im menschlichen cerebrospinalen Liquor, und obwohl der Sorbitolstoffwechselweg in Nervengeweben nachgewiesen wurde (Gabbay et al.1966), konnte bisher noch nicht der Nachweis erbracht werden, daß das Rückenmark die Quelle der Fruktose im Liquor darstellt (Steward und Passonneau 1964, Gabbay und O'Sullivan 1968).

Seit bewiesen wurde, daß die Linse in vitro freie Fruktose aus Glukose über den Sorbitolweg produziert (Kinsey et al. 1958, Kuck 1961), kann als hinreichend gesichert angenommen werden, daß alle im Kammerwasser vorkommende Fruktose von der Linse stammt, obwohl zumindest die Möglichkeit besteht, daß ein Teil dieser Kammerwasserfruktose von anderen Augengeweben gebildet wird, die mit der vorderen und hinteren Kammer des Auges korrespondieren.

Außer der Linse besitzt noch das Corneaepithel einen überraschend hohen Fruktosespiegel, so daß ein eigener Fruktosemetabolismus postuliert wird.

2. Stoffwechselwege der Fruktose

Die Leber ist im Stoffwechsel der Fruktose von zentraler Bedeutung. Nach Levine und Huddlestun nimmt sie etwa 85% der infundierten Fruktose auf und setzt sie mit großer Leichtigkeit um.

Die Fruktose wird von der Leber 2 mal so schnell metabolisiert wie Glukose und ist auch ein besserer Glykogenbildner als die übrigen Zucker.

Im Muskel jedoch ist im Gegensatz zur Leber die Glukose der bessere Glykogenlieferant, was mit der Tatsache zusammenhängen mag, daß die Glukose im Muskel die Phosphorylierung der Fruktose durch die spezifischen Hexokinasen hemmt. Nicht nur die Leber sondern auch Darmschleimhaut und Nierenparenchym besitzen die für den Fruktosestoffwechsel spezifischen Enzyme, und es wurde bewiesen, daß Fruktose nur bei hepatektomierten, nephrekt- und eviszerierten Tieren nicht mehr umgesetzt werden kann.

So scheint es von Bedeutung, daß die Fruktose bei ihrem Abbau auf einer späteren Stufe in die Glykolyse eingeschleust wird. Denn sie geht nicht unmittelbar unter Erhaltung der C_6-Kette in Glukose über, sondern wird erst zu C_3-Verbindungen abgebaut.

Die Synthese der Fruktose läuft über den Sorbitolweg ab, der aus zwei Enzymen besteht, die die Umwandlung der freien Glukose zu ihrem Alkohol Sorbit und weiter zu Fruktose katalysieren.

D-Glukose + NADPH-H $\xrightarrow{\text{Aldosereduktase}}$ Sorbit + NADP

Sorbit + NAD $\xrightarrow{\text{Sorbitoldehydrogenase}}$ D-Fruktose + $NADH+H^+$

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß zwar der Sorbitolweg in vielen Geweben nachgewiesen werden kann, die Sorbitkonzentration aber nur in Linse, Ischiasnerv und Nierenparenchym pathologisch hohe Werte erreicht, um osmotisch zu wirken.

Der Zuckeralkohol Sorbit wird bei Diabetes und Galaktosämie durch die im Überangebot vorhandene intrazelluläre Aldosereduktase vermehrt gebildet. Da die Zellwand für ihn fast ein unüberwindliches Hindernis darstellt, wird er in der Zelle zurückgehalten. So accumuliert Sorbit und sein ebenfalls nur wenig utilisierter Ketozucker Fruktose und verursacht durch Osmose Schwellung und Linsentrübung oder Neuropathien (Gabbay 1973).

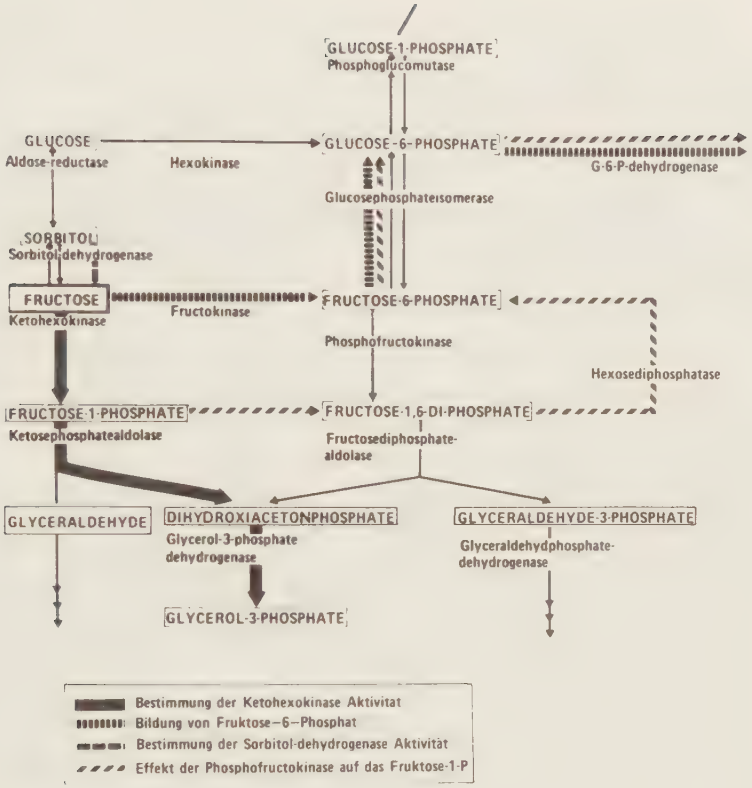

Abb. 2 Schema der Fruktosestoffwechselwege

c. Glykogen

1. Vorkommen des Glykogens

Das verzweigte Polysacharid wird als schnell verfügbares Reservekohlenhydrat vor allem in Leber und Muskel gespeichert. Vergleichbar ist sein Gehalt in anderen Organen und Geweben gering und in seiner Bedeutung als Reservestoff und Quelle zur lokalen Energiegewinnung nur unzureichend erforscht.

Wir wissen dank der Arbeiten von Shimizu und Kumamoto 1952, Friede 1966 und Ibrahim 1970, daß das Glykogen im Gehirn und Rückenmark eine ungleiche Verteilung aufweist. Diese Gebiete vornehmlich der grauen Substanz, die nachweislich mehr Glykogen enthalten, sind außergewöhnlich vulnerabel, so daß in diesem Fall eine Rolle als zusätzlicher Schutzmechanismus gegen z.B. Ischämie und Anoxie denkbar ist. Außerdem wird angenommen, daß das neuronale Glykogen in die synaptische Erregungsübermittlung einbezogen ist (Shanthaveerappa 1966).

Retinales Glykogen wiederum, enthalten hauptsächlich in den Müllerschen Stützzellen und in geringerem Maße in den Photorezeptorzellen, spielt eine wichtige Rolle in der Hell-Dunkel Adaptation. So weist die Dunkel adaptierte Retina mehr Glykogen auf, als die dem Licht ausgesetzte (Shimizu und Maeda 1953).

Tatsache ist außerdem, daß das in der Linse vornehmlich im Kern gefundene Glykogen in beträchtlichem Maße zwischen den Tierspecies variiert. Der höchste Glykogenwert wurde für die Linse der Vögel ermittelt.

Nach Rabaey liegt die Bedeutung des Glykogens im Linsenkern der Vögel darin, daß es im speziellen Akkomodationsmechanismus dieser Spezies den Refraktionsindex erhöht, da es hier die Stelle der niedermolekularen Proteine

einnimmt. Arbeiten von Hockwin et al. bestätigen jedoch die Annahme, daß Glykogen in den Linsen anderer Species sehr wohl die Rolle eines Reservekohlenhydrates spielen kann, da eine starke Abhängigkeit von Störungen des Carbohydratmetabolismus besteht und Homogenate von Kalb- und Rinderaugen alle Enzyme enthalten, die benötigt werden, um zugeführtes Glykogen zu verstoffwechseln (Süllmann 1937).

Auch die Lokalisation des Glykogens, nämlich der Linsenkern, der sich am weitesten von der Kammerwasserversorgung befindet, spricht dafür.

Die Ergebnisse von Wassilewa, Hockwin und Korte geben einen Einblick in die Abhängigkeit des Glykogengehalts verschiedener Augengewebe von der Durchblutung. Sie fanden heraus, daß es unter Druckischämie in der Netzhaut und weniger ausgeprägt im Glaskörper zu einer Glykogenverminderung kommt. Auch in der Hornhaut, weniger in Iris und Aderhaut tritt ein Abfall des Glykogengehalts auf, während man in der Linse keine Glykogenveränderung findet. Der Mehrverbrauch an Glykogen wird hier im Zusammenhang mit der Verschiebung vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel gesehen.

Bezüglich der Cornea wissen wir durch Calmettes, Deodati, Planel und Bec 1956 und Reim und Lichte 1965, daß gerade das Epithel große Glykogenvorräte besitzt.

2. Aufbau des Glykogenmoleküls

Die stark verzweigte Polyglukose besteht aus Haupt- und Seitenketten mit α - 1 → 4 glykosidischen Bindungen zwischen den Glukosebausteinen, während die Verzweigung durch eine α - 1 → 6 glykosidische Bindung zustande kommt. Wir unterscheiden unter den Glykogenmolekülen große α-Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 1000 Å und einem Molekulargewicht von 100 - 400 x 10^6 und kleinere ß-Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 300 - 400 Å und einem Molekulargewicht von 4 - 10 x 10^6 (Revel 1964, Drochmans und Dantan 1968, Wanson und Drochmans 1968).

Beide Partikel können elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, wobei die α-Partikel Konglomerate in Rosettenform der kleineren ß-Partikel sind, und liegen entweder frei im Cytoplasma oder gebunden an das Endoplasmatische Retikulum vor. Die kleinste Untereinheit der ß-Partikel gewonnen durch Extraktion mit KOH ist nur 150 - 220 Å groß und hat ein Molekulargewicht von 1 - 5 x 10^6 (Childress et al 1970).

Diese verschiedenen Partikelgrößen spiegeln wohl unterschiedliche Löslichkeiten wider, die wahrscheinlich direkt vom Molekulargewicht abhängen. Wir wissen z.B., daß sich 50% des Muskelglykogens und 80% des Leberglykogens in der löslichen, das heißt schnell verfügbaren Form befindet (Leske und Mayersbach 1969).

Unlösliches Glykogen ist hochmolekular und an Protein gebunden. Lazarow (1942) fand heraus, daß das durch Zentrifugieren gewonnene ungebundene Glykogenpartikel sich aus 92 - 93,5% Kohlenhydrat, annähernd 1% Protein und restlichem Wasser zusammensetzt.

Hatte man zuerst angenommen, dieser kleine Proteinanteil spiele eine wichtige Rolle in Bildung und Zusammenhalt von Granulae aus dispergierten Glykogenmolekülen, so glaubt man jetzt, es stelle die Enzyme des Glykogenstoffwechsels dar, die in enger Nachbarschaft zum Glykogenmolekül liegen.

Ein bedeutsamer Faktor, um das enge zum Teil paradoxe Zusammenwirken von Glykogen und seinen Enzymen unter pathologischen Bedingungen wie z.B. Anoxie und Tod zu erklären, ist ihre gleiche topographische und zum Teil auch cytologische Verteilung. Sie wirken also sowohl als Struktur- wie auch als Funktionseinheit.

Von Sutherland und Wosilait (1956) wurde bereits biochemisch ein Komplex zwischen Glykogen und Phosphorylase beschrieben. Andere Autoren bestätigten dies und fügten dem Komplex folgende Enzyme hinzu:

Branching Enzym (Amylo-1.4 $\rightarrow$1.6 Transglykosylase), Glykogensynthetase (UDP-Transglykosylase), Synthetasekinase, Synthetasephosphatase und Phosphorylasephosphatase (Stetten und Stetten 1960, Selinger und Schramm 1963, Sie et al. 1964, Steiner et al. 1965, Appleman et al. 1966, Rottenberg et al. 1972).

3. Stoffwechselwege des Glykogens

Ausgangspunkt der Biosynthese des Glykogens ist das Glukose-6-Phosphat, das durch die katalysierende Phosphoglukomutase in Glukose-1-Phosphat verwandelt wird. Die Glykogenbildung aus Glukose-1-Phosphat kann auf zwei verschiedenen Wegen vor sich gehen. Ein Weg verläuft über die Phosphorylase, die in vitro α-1→ 4 Verbindungen synthetisiert. Das Branching Enzym (Amylo-1.4 → 1.6 Transglykosylase) ist für den periodischen Aufbau der α-1→ 6 Bindungen verantwortlich. Die Phosphorylase katalysiert diese Reaktion reversibel (Cori und Cori 1943), obwohl in vivo das Gleichgewicht zu Gunsten der Glykolyse liegt. Die Phosphorylase tritt in 2 Formen auf: der aktiven a und der inaktiven b Phosphorylase. Die Phosphorylase a ist ein Tetramer, die durch Spaltung in ihr Dimer unter Freisetzung von 4 Mol bzw. 2 Mol anorganischen Phosphats in ihre b Form übergeht. Die Balance zwischen a und b wird durch eine Vielzahl von Faktoren gehalten, die auf 4 Enzyme einwirken: ATP, Mg^{++}, cAMP, Phosphorylase-b-kinase, Phosphorylase-phosphatase, Phosphodiesterase und Adenylcyclase.

Der Hauptweg der Glykogensynthese in vivo geht mit Hilfe des gruppenübertragenden Coenzyms UDP vor sich, das vermittels der spezifischen Synthetase (UDP-Transglykosylase) den Glukoserest auf den hierfür benötigten Glukosekeim überträgt. Die Synthetase existiert wieder in einer inaktiven (dependent) und einer aktiven (independent)Form, die von Hormonen und anderen Faktoren reguliert wird. (Ibrahim 1975, Rapoport 1969)

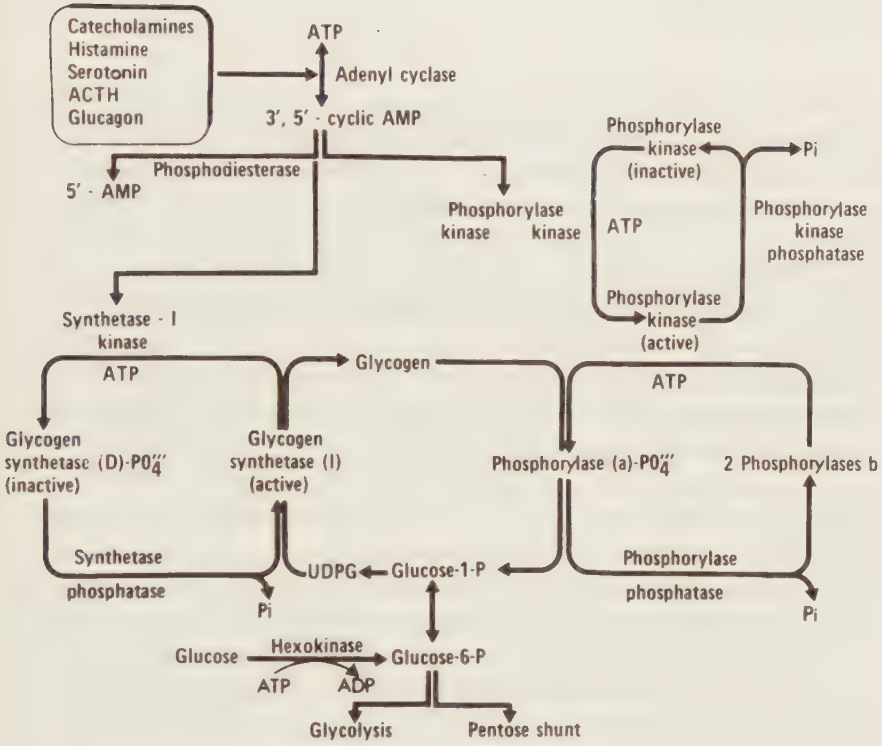

Abb. 3 Vereinfachtes Schema des Glykogenstoffwechsels

V. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen das Hornhautepithel und das Kammerwasser von Rinderaugen auf Schwankungen der Metabolitspiegel Glukose, Fruktose und Glykogen abhängig von der Lagerungsdauer untersucht werden.

Von Interesse sind hierbei besonders die post mortem entstehenden Veränderungen der Metabolitgehalte der im ganzen Bulbus verbleibenden Cornea. Außerdem kann der Strom nutritiver Metabolite, die das Hornhautepithel lebensfähig erhalten, durch das Konzentrationsgefälle von Kammerwasser zum Epithel verfolgt werden.

Diese Arbeit möge zur Klärung beitragen, wie lange Glukose als Energielieferant in Betracht kommt und in wie weit die Fruktose im Kammerwasser und Epithel für die aktiven Stoffwechselleistungen der Hornhaut herangezogen wird.

Auch das zellgebundene Glykogen wird auf seine Bedeutung als Energielieferant und Kohlenhydratspeicher für die Cornea untersucht.

Da die Lagerungsbedingungen der im Experiment benutzten Rinderbulbi mit der Konservierung menschlicher Spenderhornhäute identisch sind, ist die Beantwortung der aufgeworfenen Fragen von größter aktueller Bedeutung.

B. Material und Methodik

I. Materialgewinnung und Lagerungsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurde Glukose, Fruktose und Glykogen im Corneaepithel sowie Glukose und Fruktose im Kammerwasser untersucht bei Lagerung ganzer Bulbi bis zu 48 Stunden in einer feuchten Kammer. Dabei wurden ausschließlich Rinderaugen verwendet.

In dem neu errichteten Marburger Schlachthof konnten circa 40 Tiere pro Stunde im Fließbandverfahren getötet und geschlachtet werden. Die Zeit zwischen dem Töten durch Abstechen und der Enukleation der Augen betrug bis zu 30 Minuten.

Die enukleierten Bulbi wurden sofort mit Aqua dest. abgespült, um Verunreinigungen wie z.B. Blut zu beseitigen. Außerdem wurde darauf geachtet, daß nur Augen von ausgewachsenen Rindern mit klarer und unversehrter Hornhaut gesammelt wurden.

Um die Versuchsergebnisse nicht durch übereinstimmende Werte korrespondierender Augen zu verfälschen, wurde nur ein Auge verwendet und das kontralaterale verworfen. Die gewonnenen Bulbi wurden entweder sofort verarbeitet, d.h. noch im Schlachthof warm abradiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, oder erst nach Lagerung im Labor. Für die Lagerungsversuche wurden die Augen noch im Schlachthof in vorher präparierte feuchte Kammern gebettet, um den Lagerungsbeginn nicht durch die Transportzeit zum Labor zu verzögern. Da die Zeit vom Tod bis zur Enukleation nicht konstant gehalten werden konnte, wurde stets nur eine kleine Serie von 10 - 12 Augen gesammelt. Die verflossene Zeit vom Töten der Tiere bis zum Beginn der Inkubation betrug also ca. 30 - 40 Minuten.

Daraus wurde eine konstante Todeszeit für die Serie ermittelt, die als zeitlicher Beginn des Lagerungsversuches galt.

II. Aufbereitung von Gewebe und Kammerwasser

Die Hornhaut des noch einmal gut abgespülten Bulbus wurde mit einem Hockeymesser vom Zentrum zur Peripherie hin abradiert, wobei ein ca. 2 mm breiter Ring am Limbus ausgespart wurde. Auf diese Weise wurde vermieden, fremdes Gewebe mitzuerfassen. Die Hornhaut wurde in zwei Hälften geteilt und so in gleichen Epithelportionen abradiert, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Eine Hälfte diente zur kombinierten Bestimmung von Glukose und Fruktose, die andere zur Bestimmung von Glykogen im Epithel. Anschließend wurden die Epithelportionen in vorgekühlten und gekennzeichneten Gläschen in einer Tiefkühltruhe bei -20° Celsius bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Abrasio des Corneaepithels einschließlich des Gefrierens dauerte bei einer Versuchsreihe von 10 Augen ca. 5 Minuten.

Zur Gewinnung des Kammerwassers wurde die Vorderkammer mit einer Spritze punktiert; dabei wurde wieder darauf geachtet, Fremdgewebe durch Verletzen von Iris oder Endothel nicht mitzuerfassen. Es konnten ohne Schwierigkeit 2 ml Kammerwasser entnommen werden, die bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in der Kühltruhe gelagert wurden.

Die Punktion wurde entweder sofort auf dem Schlachthof oder erst nach Lagerung der Bulbi durchgeführt.

III. Extraktgewinnung

a. Extraktgewinnung zur kombinierten Bestimmung von Glukose und Fruktose im Epithel

Das gefrorene Abradat wurde in einem Glas-in-Glas Homogenisator nach Potter aufgefangen, der vorher mit 1,5 ml O,5 n eisgekühlter Perchlorsäure beschickt worden war.

Mit der Waage Mettler Typ H16 (Fa. Spoerhase Gießen) wurde die Einwaage bestimmt. Anschließend folgte das Homogenisieren des Gewebes 5 Minuten lang unter ständigem Kühlen in Eiswasser bis eine milchige Emulsion entstand.

Die Perchlorsäure hatte eine Eiweißfällung und eine Spaltung der Enzyme zur Folge. Nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 30 000 U/Min. mit der Zentrifuge Omicron (Fa. Christ, Osterode) wurde der Überstand mit 10 n KOH auf pH 7 gebracht. Der pH wurde mit einer Einstabmeßkette (Lot 405-MS, Fa. Dr. Ingold) in Verbindung mit einem pH-Meter (Typ 13, Fa. Knick, Berlin) kontrolliert. Anschließend wurde aus dem neutralisierten Extrakt das schwerlösliche $KClO_4$ 5 Minuten lang bei 30000 U/Min. abzentrifugiert und aus dem klaren Überstand die kombinierte Bestimmung von Glukose und Fruktose vorgenommen.

b. Extraktgewinnung zur Glykogenbestimmung im Epithel

Das tiefgefrorene Abradat wurde in einem Zentrifugenglas aufgefangen, das mit 1 ml vorgewogener 20% NaOH beschickt worden war. Anschließend folgte das 15 minütige Kochen des Gewebes in einem Wasserbad. Um ein Verdampfen der Flüssigkeit zu verhindern, wurde das Zentrifugenglas mit einer Glaskugel abgedeckt.

Durch das Kochen in NaOH hatte sich das Gewebe verflüssigt und aufgeschlossen, so daß das darin enthaltene Glykogen nur noch durch Zusatz von Alkohol ausgefällt werden konnte. Es wurden also 4 ml absoluten Alkohols dazupipettiert, die Suspension 1 Stunde stehen gelassen und 10 Minuten bei der Höchstumdrehungszahl von 70 000 pro Min. zentrifugiert. Danach folgte ein erneutes Aufschwemmen mit 4 ml absolutem Alkohol und wiederholtes Zentrifugieren 10 Min. bei gleicher Umdrehung. Durch anschließendes Dekantieren und Verdampfen des Restalkohols im Trockenschrank war reines Glykogen isoliert worden. Die Hydrolyse des Glykogens in seine Glukosebausteine erfolgte durch 90 minütiges Kochen in 1,5 ml 2n H_2SO_4 im Wasserbad. Anschließend wurde der Extrakt wieder mit 10 n KOH auf pH 7 gebracht.

An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, daß bei Versuchsreihen, in denen die Laborzentrifuge Typ U J III (Fa. Christ) mit Höchstumdrehungszahl von 30 000 - 40 000 verwendet wurde, weit niedrigere Glykogenwerte gewonnen wurden als mit der Kühlzentrifuge Omicron (Höchstumdrehung 70 000/Min.).

Nachdem daraus geschlossen werden konnte, daß nicht genügend Glykogen im Sediment abzentrifugiert worden war, wurden diese Versuchsreihen verworfen und ausschließlich die Ultrazentrifuge benutzt.

c. Extraktgewinnung zur kombinierten Bestimmung von Glukose und Fruktose im Kammerwasser

Von dem durch Punktion gewonnenem Kammerwasser wurden 0,4 ml entnommen und in 1 ml eiskalte Perchlorsäure gegeben. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 30 000 U/Min., Neutralisieren und erneutem Zentrifugieren konnte im klaren Überstand der Metabolitspiegel gemessen werden.

IV. Quantitative Analyse

Bei der enzymatischen Bestimmung der Glukose handelt es sich um eine stöchiometrische Substratmessung, d.h. für jedes Mol umgesetztes Substrat wird ein Mol Pyridinnukleotid hydriert bzw. dehydriert.

Dieser Vorgang wird im enzymatisch-optischen Test nach Warburg sichtbar gemacht. Dabei wird das NADPH/NADP - System als Indikator genutzt, das bei der Wellenlänge 340 nm sein Absorbtionsmaximum besitzt.

Das gewählte Hexokinaseverfahren läuft folgendermaßen ab:

1. Gluc + ATP $\xrightarrow[Mg\ ++]{Hexokinase}$ Gluc-6-P + ADP

2. Gluc-6-P + NADP $\xrightarrow{G\text{-}6\text{-}PDH}$ 6-P-gluconat + NADPH

3. Fruc-6-P $\xrightarrow{PHI}$ Gluc-6-P

Es wird also die proportionale Extinktionszunahme von NADPH bei 334 nm gemessen. Das bedeutet, daß der Endwert des entstandenen NADPH der gesuchten Glukosemenge entspricht.

Bei der kombinierten Glukose/Fruktose Bestimmung wird nach der abgelaufenen Reaktion 1 und 2 das Enzym Phosphohexose-isomerase zugegeben, welches das im Extrakt vorhandene Fruktose-6-P zu Glukose-6-P isomerisiert, das anschließend über das Zwischenferment mit NADP als Indikator stöchiometrisch umgesetzt wird.

Das endogene Fruktose-6-P im Epithel der Cornea liegt unter der Nachweisgrenze dieser Methode.

Wenn nach Zusatz der PHI in diesem Testsystem eine Reaktion abläuft, muß es sich um neu phosphorylierte Fruktose handeln. Diese Phosphorylierung ist eine unspezifische Leistung der HK, die eine Fruktokinase Aktivität von rund 10% ihrer Glukokinase Aktivität besitzt.

Da sowohl die Hilfsenzyme ATP und NADP im Überschuß vorliegen, kann der enzymatisch-optische Test erneut ablaufen. Der Endwert des erhaltenen NADPH entspricht dann der gesuchten Fruktosemenge (Bernt und Bergmeyer).

Das Glykogen wurde im enzymatisch-optischen Test in Form von Glukosebausteinen gemessen.

Bei Ausführung der enzymatischen Metabolitbestimmung wurde ein Eppendorf-Photometer in Verbindung mit dem Eppendorf-Kompensationsschreiber 65 II verwendet. Die benötigten Enzyme und Substrate lieferten die Firmen Boehringer Mannheim und E. Merck Darmstadt. Für die Lösungen und Testansätze wurde ionenfreies Wasser mit mehr als 1 Mega Ohm Leitwiderstand verwendet. Testreagentien und Extrakte wurden mit dem Eppendorf-Mikropipettensystem abgemessen.

Der Lichtweg von den Mikro- und Halbmikroküvetten beträgt d = 1 cm d = 2 cm und d = 4 cm.

Während des Testes wurden die Küvetten durch einen Thermostaten konstant auf 25^{o}C gehalten.

V. Testansätze

Enzymatische Bestimmung von Glukose und Fruktose im kombiniertem Test:

Schreibskala O -1, O - 0,5, O - 0,25
Filter 334 nm
Normalküvette d = 1, Halbmikroküvetten d = 2, d = 4

0,3 M Triäthanolamin Puffer / 3mM $MgSO_4$		pH=7	2,5 ml
ATP / NADP			0,2 ml
16 mM ATP / 12 mM NADP			
Extrakt			0,05 - 0,4 ml
Hexokinase	c = 10	1 : 10	0,02 ml
Start mit G-6-PDH	c = 5	1 : 5	0,02 ml
Nach Ablauf der Reaktion			
Bestimmung von Fruktose-6-P			
Start mit PHI	c = 10	1 : 10	0,02 ml

Enzymatische Bestimmung der " Glykogen "-Glukose

Schreibskala O - 1
Filter 334 nm
Normalküvette d = 1

TRAP/ EDTA	100 mM / 1 mM		pH = 7,6	0,50 ml
$MgCl_2$	100 mM			0,01 ml
ATP	75 mM		c = 45,5	0,01 ml
TPN	25 mM		c = 20	0,02 ml
G-6-PDH	1 : 10		c = 5	0,01 ml
Extrakt	0,025 ml	oder 0,05 ml	oder 0,1 ml oder	0,2 ml
+	+	+	+	+
H_2O	0,425 ml	0,4 ml	0,35 ml	0,25 ml
Start mit Hexokinase	1 : 10	c = 10		0,01 ml

" Start " bedeutet, daß nach Ablauf der vorangegangenen Reaktion und nach Rühreffektkontrolle das Enzym auf einem dünnen Kunststoffstab (" Plümper ") ohne Substanzverlust in die Küvette eingerührt wird.

Es wurden von allen Extrakten Doppelbestimmungen durchgeführt und die Resultate gemittelt. Bei abweichenden Ergebnissen beider Analysen um mehr als 10% wurden die Teste verworfen und neue angesetzt.

VI. Berechnung der Ergebnisse

Zur Berechnung der Metabolitkonzentrationen wurde folgende Formel benutzt:

$$\frac{\Delta E \cdot \text{Testvolumen} \cdot \text{Faktor}}{\varepsilon \cdot \text{Einsatzvolumen} \cdot d} = \text{Mol / g Feuchtgewicht}$$

ΔE = Extinktionsdifferenz

$\text{Faktor} = \frac{\text{Volumen}}{\text{Gewicht}}$

ε = Extinktionskoeffizient (für 334 nm = 6,09 · 10)

VII. Statistische Auswertung

Getestet wurde für die drei Parameter Glukose, Fruktose und Glykogen getrennt die Hypothese:

H_o : Die Werte der 9 Zeitpunkte unterscheiden sich nicht voneinander.

Testmethode : Simultane Testprozedur nach Gabriel, die eine Verallgemeinerung des t- Testes auf mehr als zwei Stichproben bedeutet mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0{,}05$.

Bei allen drei Parametern wurde die obige Hypothese verworfen und es ergaben sich die aufgeführten signifikanten Unterschiede.

In gleicher Weise (Testmethode und Ergebnis) wurde bei dem Quotienten Glukose/Fruktose verfahren.

Mittelwert, Varianz, Standardabweichung und Standardabweichung des Mittelwerts wurden nach folgenden Formeln berechnet:

Mittelwert der Stichproben: $M = \frac{\sum x}{N}$

Anzahl der Stichproben : N

Varianz der Stichproben : $S^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^{n} (x_i - x)^2$

Standardabweichung der Stichproben : $S = \sqrt{s^2}$

Standardabweichung des Mittelwertes : $S_m = \frac{s}{\sqrt{N}}$

C. Ergebnisse

I. Makroskopische Veränderungen der gelagerten Hornhäute

Nach 24 Std. Lagerung isolierter Bulbi wurde in der vorliegenden Arbeit von der Peripherie ausgehend eine zarte Trübung der Hornhaut entdeckt. Nach 30 Std. zeigte sich die gesamte Cornea getrübt, während sie nach 48 Std. milchig undurchsichtig war und sich in ihrem Epithelverband vom Stroma löste.

II. Ergebnisse der enzymatischen Bestimmung von Glukose in Epithel und Kammerwasser

Bezüglich der Glukose im Hornhautepithel kann zum Zeitpunkt t_o ein Gehalt von 1,755 µMol/g Frischgewicht ermittelt werden. Unter den besprochenen Lagerungsbedingungen fällt der Glukosespiegel kontinuierlich ab: nach 2 Std. um 16%, nach 4 Std. um 54%, nach 6 Std. um 44% und nach 8 Std. um 57 %.

Bei t_5 = 12 Std. ist ein Tiefpunkt der Kurve mit nur 22% des Ausgangswertes erreicht. Nach 24 und 30 Std. folgt noch einmal ein Anstieg des Glukosespiegels auf 59 bzw. auf 66% des Ausgangswertes, um nach 48 Std. den tiefsten Stand von 0,343 µMol Glukose zu erreichen, d.h. 19% des Ausgangswertes. (Abb. 4)

Die statistische Auswertung zeigt, daß die Werte $t_o : t_4$, $t_o : t_5$, $t_o : t_8$, $t_1 : t_5$ und $t_1 : t_8$ signifikante Unterschiede aufweisen ($\alpha = 0{,}05$).

Stichproben aus dem Kammerwasser ergeben einen Ausgangswert zur Zeit t_o von 3,256 µMol/g Kammerwasser. Nach den ersten 12 Std. Lagerung wird ein Glukosesturz auf 2,7% des Ausgangswertes ermittelt, und zwar verringert sich der Glukosespiegel nach 2 Std. um 33%.

Nach 4 Std. verringert sich der Glukosespiegel um 42%, nach 6 Std. um 91% und nach 8 Std. um 86%.

Zur Zeit t_6, t_7 und t_8 bewegt sich der Glukosewert an der Grenze des Nachweisbaren, nämlich 0,3%, 0,1% und 0,05% des Ausgangswertes. (Abb. 4)

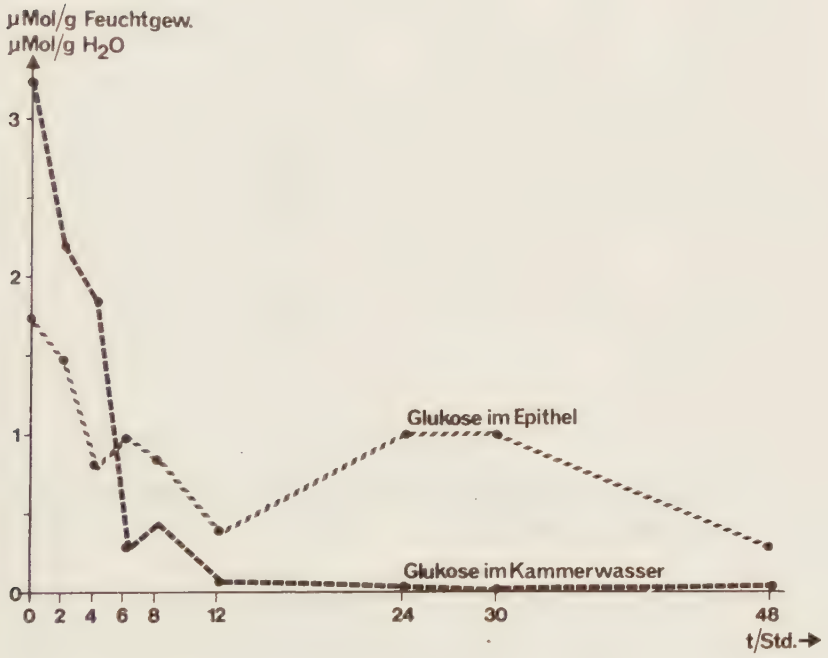

Abb. 4 Glukose in Corneaepithel und Kammerwasser in Abhängigkeit von der Lagerungszeit.

Lagerungszeit t	Mittelwert m	Standardabweichung vom Mittelwert s_m	Varianz v	Anzahl der Stichproben n
t_o = 0 Std.	1,755	0,272	0,740	10
t_1 = 2 Std.	1,486	0,115	0,132	10
t_2 = 4 Std.	0,812	0,092	0,084	10
t_3 = 6 Std.	0,983	0,223	0,499	10
t_4 = 8 Std.	0,760	0,094	0,088	10
t_5 = 12 Std.	0,392	0,038	0,015	10
t_6 = 24 Std.	1,031	0,206	0,426	10
t_7 = 30 Std.	1,163	0,266	0,711	10
t_8 = 48 Std.	0,343	0,035	0,012	10

Tab. 1 Glukose im Hornhautepithel (µMol/g Feuchtgewicht) zur Zeit t_o bis t_8 .

Lagerungszeit t	Mittelwert m	Anzahl der Stichproben n
t_o = 0 Std.	3,256	2
t_1 = 2 "	2,200	2
t_2 = 4 "	1,879	2
t_3 = 6 "	0,304	2
t_4 = 8 "	0,445	2
t_5 = 12 "	0,089	2
t_6 = 24 "	0,009	2
t_7 = 30 "	0,004	2
t_8 = 48 "	0,002	2

Tab. 2 Glukose im Kammerwasser (µMol/g Kammerwasser) zur Zeit t_o bis t_8

III. Ergebnisse der enzymatischen Bestimmung von Fruktose in Epithel und Kammerwasser

Unter den bekannten Lagerungsbedingungen wird auch der Fruktosegehalt im Corneaepithel untersucht. Dabei wird zur Zeit t_o ein überraschend hoher Fruktosespiegel von 0,732 µMol/g Frischgewicht ermittelt. Nach 2 Std. Lagerungszeit kann ein kurzfristiger Fruktoseanstieg um 30% festgestellt werden. Bis 8 Std. Lagerung bleibt dann der Fruktosespiegel fast konstant, um nach 12 Std. wieder auf 45% des Ausgangswertes zu sinken. Dieser Metabolitpegel verändert sich bis 30 Std. wenig, um nach 48 Std. mit 0,084 µMol/g Feuchtgewicht sein tiefstes Niveau zu erreichen. (Abb. 5)

In der statistischen Auswertung zeigen die Werte $t_o : t_5$, $t_o : t_6$, $t_o : t_7$, $t_o : t_8$;

$t_1 : t_5$, $t_1 : t_6$, $t_1 : t_7$, $t_1 : t_8$;

$t_2 : t_6$, $t_2 : t_8$;

$t_3 : t_6$, $t_3 : t_7$, $t_3 : t_8$;

$t_4 : t_6$ und $t_4 : t_8$ signifikante Unterschiede. ($\alpha = 0,05$)

Stichproben aus dem Kammerwasser weisen nach, daß dort nur Spuren von Fruktose zu finden sind. Dieser niedrige Fruktosespiegel wird bei t_o auf 0,093 µMol/g Kammerwasser gemittelt. Er bleibt bis zu 8 Std. konstant, um sich dann bis zu 30 Std. Lagerung auf 74% des Ausgangswertes zu halten. Nach 48 Std. werden immer noch 41% der Ausgangsfruktose gemessen. (Abb. 5)

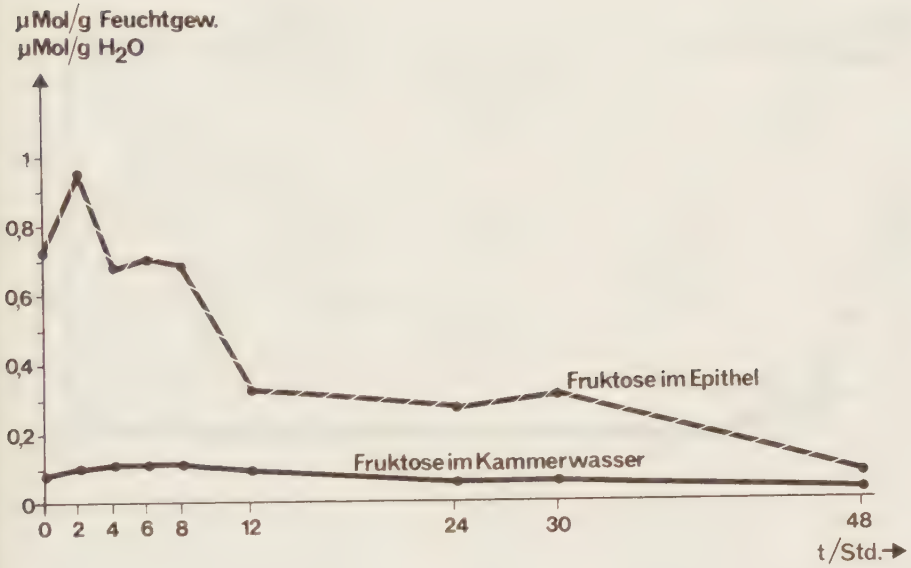

Abb. 5 Fruktose in Corneaepithel und Kammerwasser in Abhängigkeit von der Lagerungszeit

Bei Betrachtung des Verhältnisses Glukose/Fruktose im Corneaepithel wird ein Absinken des Quotienten von 2,5 zur Zeit t_o auf 1,1 zur Zeit t_4 festgestellt. Wie Abb. 4 und Abb. 5 beweisen, handelt es sich dabei vor allem um einen starken Glukoseverlust in den ersten 12 Std. der Lagerung. Danach steigt der Quotient durch erheblich fallende Fruktosewerte bei nahezu konstanten Glukosekonzentrationen wieder bis auf 5 bei t_8 an. (Abb. 6)

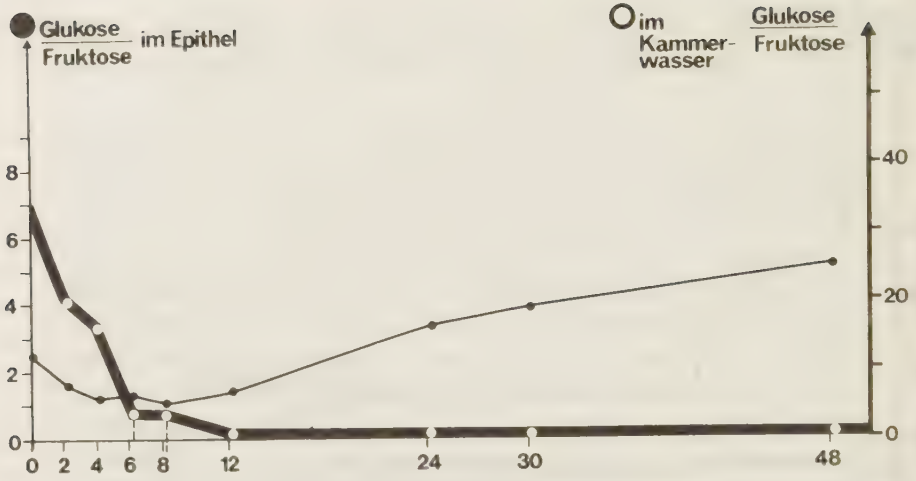

Abb. 6 Das Verhältnis Glukose / Fruktose in Corneaepithel und Kammerwasser abhängig von der Lagerungszeit.

Im Kammerwasser sind bei hohen Glukosekonzentrationen nur Spuren von Fruktose zu finden. (Abb. 4 und 5) Der Quotient zur Zeit t_o beträgt deshalb 35. Dem starken Glukoseabfall in den ersten 12 Std. der Lagerung folgend, sinkt auch der Quotient Glukose/Fruktose auf 0,9 bei t_5, um dann bei weiter fallenden Werten beider Metabolite Glukose und Fruktose nach 48 Std. 0,04 zu erreichen. (Abb. 6)

Lagerungszeit	Mittelwert	Standardabweichung vom Mittelwert	Varianz	Anzahl der Stichproben
t	m	s_m	v	n
t_o = 0 Std.	0,732	0,077	0,060	10
t_1 = 2 Std.	0,954	0,112	0,126	10
t_2 = 4 Std.	0,686	0,088	0,077	10
t_3 = 6 Std.	0,719	0,067	0,045	10
t_4 = 8 Std.	0,700	0,053	0,028	10
t_5 = 12 Std.	0,332	0,051	0,026	10
t_6 = 24 Std.	0,286	0,035	0,012	10
t_7 = 30 Std.	0,324	0,068	0,046	10
t_8 = 48 Std.	0,084	0,014	0,002	10

Tab. 3 Fruktose im Hornhautepithel (µMol/g Feuchtgewicht) zur Zeit t_o bis t_8.

Lagerungszeit t	Mittelwert m	Anzahl der Stichproben n
t_o = 0 Std.	0,093	2
t_1 = 2 Std.	0,107	2
t_2 = 4 Std.	0,115	2
t_3 = 6 Std.	0,104	2
t_4 = 8 Std.	0,115	2
t_5 = 12 Std.	0,091	2
t_6 = 24 Std.	0,066	2
t_7 = 30 Std.	0,068	2
t_8 = 48 Std.	0,038	2

Tab. 4 Fruktose im Kammerwasser (µMol/g Kammerwasser) zur Zeit t_o bis t_8.

Lagerungs-zeit	Mittel-wert	Standardab-weichung vom Mittelwert	Varianz	Anzahl der Stichproben
t	m	s_m	v	n
t_o = 0 Std.	2,502	0,357	1,278	10
t_1 = 2 Std.	1,673	0,153	0,234	10
t_2 = 4 Std.	1,223	0,077	0,059	10
t_3 = 6 Std.	1,384	0,298	0,886	10
t_4 = 8 Std.	1,117	0,128	0,164	10
t_5 = 12 Std.	1,456	0,283	0,801	10
t_6 = 24 Std.	3,357	0,463	2,144	10
t_7 = 30 Std.	3,848	0,559	3,130	10
t_8 = 48 Std.	5,049	0,911	8,303	10

Tab. 5 Das Verhältnis Glukose / Fruktose im Corneaepithel

Lagerungszeit t	Mittelwert m	Anzahl der Stichproben n
t_o = 0 Std.	35,090	2
t_1 = 2 Std.	20,486	2
t_2 = 4 Std.	16,328	2
t_3 = 6 Std.	2,932	2
t_4 = 8 Std.	3,880	2
t_5 = 12 Std.	0,978	2
t_6 = 24 Std.	0,136	2
t_7 = 30 Std.	0,054	2
t_8 = 48 Std.	0,044	2

Tab. 6 Das Verhältnis Glukose / Fruktose im Kammerwasser

III. Glykogen

Bezüglich des zellgebundenen Glykogens im Corneaepithel wird ein Glykogenanstieg auf 170% des Ausgangswertes in den ersten 8 Std. nachgewiesen (t_o = 65,157 µMol/g Frischgewebe). Danach folgt wieder ein langsamer Glykogenabfall. Der Ausgangswert wird nach 27,5 Std. erneut erreicht. Nach 30 Std. beträgt der kleinste Glykogenwert immer noch 80% des O-Wertes. (Abb. 7)

Die statistische Auswertung zeigt, daß die Werte $t_o : t_4$, $t_1 : t_4$, $t_2 : t_4$, $t_4 : t_7$, $t_4 : t_8$ und $t_5 : t_7$ signifikante Unterschiede aufweisen (α= 0,05).

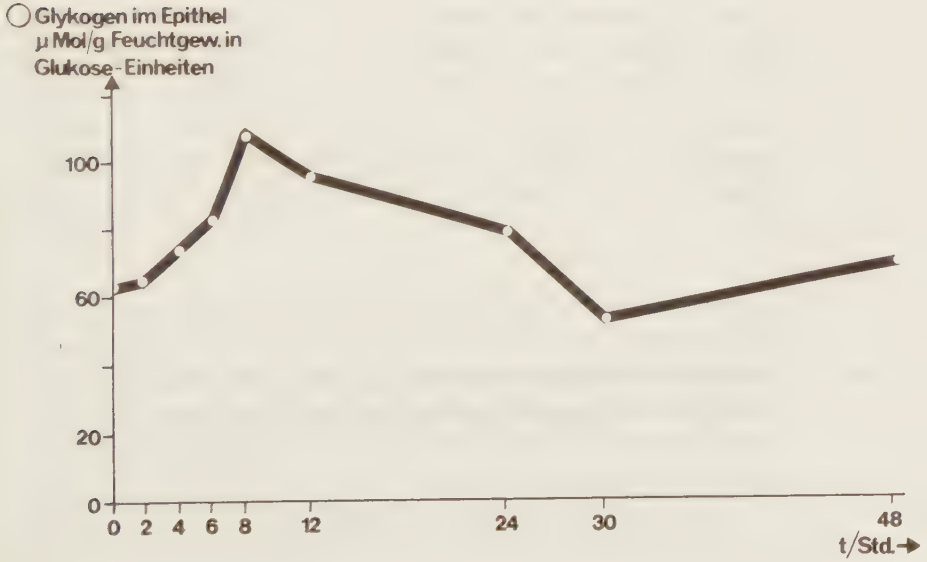

Abb. 7 Glykogen im Hornhautepithel (µMol/g Feuchtgewicht) in Glukose-Einheiten abhängig von der Lagerungszeit.

Lagerungs-zeit	Mittel-wert	Standardab-weichung vom Mittelwert	Varianz	Anzahl der Stichproben
t	m	s_m	v	n
t_o = 0 Std.	65,175	5,974	356,938	10
t_1 = 2 Std.	67,485	4,631	214,445	10
t_2 = 4 Std.	76,445	2,580	66,570	10
t_3 = 6 Std.	84,284	7,981	636,937	10
t_4 = 8 Std.	110,933	7,956	633,071	10
t_5 = 12 Std.	96,346	6,483	420,359	10
t_6 = 24 Std.	82,102	4,423	195,671	10
t_7 = 30 Std.	54,359	2,496	62,318	10
t_8 = 48 Std.	71,517	5,987	358,493	10

Tab. 7 Glykogen im Hornhautepithel (µMol/g Feuchtgewicht) in Glukose-Einheiten zur Zeit t_o bis t_8.

D. Diskussion

I. Glukose

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Glukosewerte des Epithels und des Kammerwassers stimmen recht gut mit denen der Literatur überein. Reim, Lax, Lichte, Turss (1967) 1,842 ± 0,286 µMol/g Frischgew. Glukose im Corneaepithel von Rinderaugen.

Förster untersuchte 1969 bei gleichen Lagerungsbedingungen unter anderem die Veränderungen der vorwiegend extrazellulär vorkommenden Substanz Glukose abhängig von der Lagerungszeit. Er verwandte in seinen Experimenten ebenfalls Rinderaugen und kam dabei im Hornhautepithel zu einem O-Wert von 1,334 ± 0,109 µMol Glukose/g Frischgew. bei n=4, vergleichbar mit dem in dieser Arbeit gefundenen Glukosewert von 1,755 ± 0,136 µMol/g Frischgew. bei n=10. Förster stellte ebenfalls einen kontinuierlichen Abfall der Glukose im Epithel fest und kam dabei nach 18 Std. Lagerungsdauer an die Grenze der Nachweisbarkeit.

Der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Glukoseanstieg zwischen t_6 und t_9 konnte an Hand der Literatur nicht gestützt werden. Reim und Ashauer (1975), die das intrazellular gebundene Glukose-6-Phosphat bei isoliert gelagerten Kaninchenhornhäuten untersuchten, fanden ebenfalls zwischen 12 und 36 Std. eine vorübergehende Anhebung des Metabolitspiegels. Sie führten ihn auf eine möglicherweise verstärkte Aktivierung des Pentosephosphatshunts zurück.

Auch die aus dem Kammerwasser entnommenen Stichproben zeigen eine annähernd gleiche Eleminationskurve für Glukose wie in der Literatur.

Förster ging von einem Glukosespiegel von 3,423 µMol/g H_2O im Kammerwasser aus, während der hier vorliegende mit 3,256 µMol/g Kammerwasser errechnet wurde. Reim, Lax, Lichte und Turss (1967) 3,30 ± 0,186 µMol/g Kammerwasser. Für das Kaninchen wurde ein doppelt so hoher Kammerwasserglukosespiegel gefunden wie beim Rind.

Dem Konzentrationsgefälle folgend, tritt die Glukose aus dem Kammerwasser ins Stroma. Innerhalb des Corneaparenchyms wird noch einmal von einem deutlichen Konzentrationsunterschied zwischen posteriorer und anteriorer Lamelle berichtet (Reim 1971).

Der Glukosesturz im Kammerwasser nach 12 Std. Lagerung deutet auf einen gesteigerten Energiebedarf der Hornhaut nach Enukleation.

Untersuchungen über Metabolitspiegel im Kammerwasser und Endothel (Reim und Turss 1968) zeigen, daß bis 30 Std. Lagerung oxidative Stoffwechselreaktionen möglich sind und die Membranfunktion des Endothels nach der Enukleation erhalten bleibt.

Ebenso fällt im Epithel zum Zeichen einer gesteigerten Glukoseutilisation der Glukosespiegel nach der oben genannten kritischen Zeit von 12 Std. Lagerung um 80% unter Aufrechterhaltung des aeroben Stoffwechsels, da die O_2 - Diffusion aus der Luft selbst für tiefere Corneaschichten ausreicht.

Bei Lagerung isolierter Hornhäute hingegen wird der Glukosepool rapide verbraucht : schon nach 30 Minuten ließ sich in Gegenwart von Sauerstoff keine Glukose mehr nachweisen (Reim und Lichte 1965).

In der vorliegenden Arbeit beträgt also der Glukoseschwund während 48 Std. Lagerung aus dem Epithel 0,029 µMol/Std. und 0,068 µMol/Std. aus dem Kammerwasser.

Riley (1969) bestimmte den Glukoseverbrauch der gesamten Kaninchenhornhaut mit 0,6 µMol/cm^2/Std.

Thoft und Friend (1972) errechneten die in vivo Glukoseutilisation des Kaninchenepithels allein, indem sie nämlich das Epithel durch Luftauffüllen der Vorderkammer von der Kammerversorgung abschnitten. Während Riley den Glukoseverbrauch an Hand der Laktatproduktion bestimmte, vernachlässigte er den Betrag, der über Pyruvat in den Tricarbonsäurezyklus eingeht oder im Pentosephosphatshunt abgebaut wird, und nicht als Laktat erscheint. Vorteil der direkten in vivo Bestimmung des Glukoseverbrauchs ist, daß alle Stoffwechselwege miterfaßt werden.

Die so in Gegenwart von O_2 ermittelte Glukoseutilisation beträgt 0,094 µMol/cm^2 / Std., in N_2 0,138 µMol/cm^2/Std. (Thoft und Friend 1972). Die dem Epithel aus dem Kammerwasser angebotene Glukose scheint folglich mit 0,61 µMol/cm^2/Std. den in vivo errechneten Energiebedarf bei weitem zu überschreiten.

Untersuchungen von Reim und Förster (1971) ergaben, daß der Adenosinphosphatspiegel von bis zu 15 Std. gelagerten Bulbi kaum abfällt, was die Annahme zuläßt, daß eine andere Energiequelle vorhanden sein muß, die diese hohen Energiepotentiale aufrechterhalten kann.

In Frage kommt das in hohen Konzentrationen im Kammerwasser und Stroma vorhandene Laktat, das bei gelagerten Augäpfeln aus den tiefen Abschnitten des Auges stammt. Diese Laktatschwemme aus dem Kammerwasser entspricht jedoch nicht den physiologischen Verhältnissen, in denen sich der Konzentrationsgradient umgekehrt verhält. Der gleichbleibend niedrige Laktat-Pyruvat Quotient im Epithel spricht für die Aufrechterhaltung des aeroben Stoffwechsels bis 15-20 Std. Lagerung nach Enukleation, d.h. Oxidation des aus dem Kammerwasser angebotenen Laktats über den Zitronensäurezyklus.

Dieses nur bei Lagerung ganzer Bulbi im Überfluß angebotene Laktat als Energiequelle garantiert für die Dauer von 3 - 5 Tagen eine relativ stabile Stoffwechsellage (Tamura 1968), die wie vorangegangen bewiesen, die Glykogenspeicher unangetastet läßt.

Die Beobachtungen des Trübungsverlaufs gleichen den Erfahrungen von Reim und Lichte (1965) und Reim und Turss (1968). Da die Transparenz der Cornea von der ausreichenden Versorgung mit nutritiven Metaboliten abhängt, scheint es verständlich, daß Trübung und Glukosesturz in Epithel und Kammerwasser nach 12 Std. zusammenfallen.

II. Fruktose

Betrachten wir die Verhältniszahlen von Glukose und Fruktose im Epithel, so fällt im Gegensatz zu anderen Körpergeweben der erstaunlich hohe Fruktosegehalt des Corneaepithels auf, der genau die Hälfte der Glukosekonzentration beträgt. Der Fruktosespiegel fällt nun in den ersten 12 Std. parallel zum Glukosespiegel rasch auf 45% des Ausgangswertes, um dann in eine flache Eliminationskurve überzugehen. Im Kammerwasser ist der Fruktosegehalt verschwindend gering: er beträgt nur 1/35 der Kammerwasserglukose, zeigt aber dafür bis 30 Std. Lagerungszeit einen nahezu konstanten Metabolitspiegel.

Wir wissen dank der Arbeit von Pletscher, Stuhlfauth und Beal, daß der Fruktosespiegel im Blut selbst nach Zufuhr großer Mengen nie auf hohe Werte ansteigt. Er bleibt beim Menschen bei oraler Zufuhr unter 10 mg/100 ml (0,555 μMol/gH_2O).

Durch intravenöse Infusion von 10% Fruktose in Dosen von 0,4 mg/kg/h konnte eine maximale Steigerung auf 89,6 mg/100 ml (4,97 µMol/g H_2O) festgestellt werden (Beal 1954), die Blutkonzentration sinkt jedoch rasch wieder auf kleine Werte ab.

Der statistisch signifikante Unterschied zwischen niedrigerer Blutfruktose und höherem Kammerwassergehalt läßt eine Sekretion oder Ultrafiltration über den Ciliarkörper ausschließen.

Auch eine Neubildung vom Epithel des Ciliarkörpers über den Sorbitolweg wird von Reddy et al. (1971) angezweifelt. Zwar sind die zwei Enzyme des Sorbitolwegs vorhanden, doch im Gegensatz zur Linse von niedriger Aktivitätsrate . Wegen des ebenfalls inaktiven Hexosemonophosphatshunts fehlt das nötige Coenzym NADPH für die Aldosereduktase. Dieses Coenzym verbindet in der Linse den Sorbitolweg mit dem Pentosephosphatshunt.

Nach Kuck und Crosswell (1974) sowie Chylack (1971) verbleibt nur die Linse als Quelle der Kammerwasserfruktose. Folglich verursacht die Linsenextraktion einen Fruktosesturz von 5,4 mg/100 ml (0,3 µMol/gH_2O) auf 1,4 mg/ 100 ml (0,07 µMol/g H_2O).

Blut und Kammerwasser des aphaken Auges zeigen also annähernd gleiche Fruktosespiegel, während die Kammerwasserglukose durch Aphakie nicht verändert wird.

Der ungewöhnlich hohe Fruktosegehalt im Corneaepithel, der genau 7,9 mal so groß ist wie im Kammerwasser, läßt auf einen eigenen Fruktosestoffwechsel schließen mit der Bildung freier Fruktose über den Sorbitolweg, wie es im Epithel der Linse, der Placenta, der Samenbläschen, der Nierenpapille und in den Schwann'schen Zellen der peripheren Nerven geschieht.

Umgekehrt läßt sich über den Sorbitolweg im Hornhautepithel bei ganzer oder teilweiser Verödung des Ciliarkörpers durch hochdosierte Fruktoseinfusionen der Glukosespiegel wieder anheben. (Schütte und Hardke persönliche Mitteilung)

Da dem Corneaepithel wie auch der Linse das Fehlen von Blutgefäßen zur Versorgung mit nutritiven Metaboliten gemeinsam ist, liegt der Gedanke nahe, daß der hohe Fruktosegehalt mit eigenständigem Fruktosestoffwechsel diese Gewebe von Schwankungen des Glukosespiegels unabhängig machen soll.

III. Glykogen

Der mittlere Glykogenwert bei Versuchsbeginn (t_o) beträgt 65,175 $\pm$ 2,987 µMol/Frischgew. Er entspricht dem von Turss,R., Friend,J. und Dohlman,C.H. (1966) bei Kaninchenaugen ermittelten Wert von 62,3 $\pm$ 4,1 µMol/g Frischgew.

Turss untersuchte unter anderem den Effekt einer dünnen Kunststoffmembran, die er als Flüssigkeitsschranke intralamellär in das Stroma implantierte. Er stellte als Ausdruck einer Schädigung des darüberliegenden Epithels einen deutlichen Glykogenabfall fest, der bis zu völligem Glykogenschwund bei Epithelulceration gehen konnte. Zu diesem Zeitpunkt läßt sich der Glykogenverlust bei Anfärbung als erstes mikroskopisch sichtbares Zeichen für eine Beeinträchtigung der Hornhaut feststellen.

Untersuchungen von Schütte (1971) über das Glykogen im Epithel der Kaninchen nach Luft- und Ölauffüllung der

Vorderkammer zeigen bei Ausschalten des Kammerwassers als Ernährungsquelle ein Aufbrauchen der Glykogenreserve, die mit dem maximalen Glukoseabfall korreliert. Nach Resorption der Luft- bzw. Silikonölblase ist der Glykogenspeicher nach 24 Std. bzw. entsprechend der verzögerten Resorption nach 5 Tagen vollständig wiederhergestellt. Schüttes Glykogenwert bei 0 Std. untersucht an Kaninchenaugen beträgt 52 µMol/g Frischgew.

Riley (1969), der die Kaninchencornea in vitro von der Oberfläche des Endothels mit künstlichem Kammerwasser beströmte, bestimmte auf diese Weise im Fließgleichgewicht den Glukoseverbrauch auf 0,6 µMol/cm^2/h. 90% davon werden von der exogen zugeführten Glukose bestritten, während sich der Rest aus der endogen vorhandenen Glukose und dem Glykogenbestand zusammensetzt. In diesen Experimenten wurde ein Glykogenverlust von 4,7 µg/h bestimmt, was einer Menge 0,03 µMol Glukoseeinheiten pro Std. aus dem Glykogen entspricht.

Es ist zu diskutieren, ob auch in vivo 0,05% des Glukosebedarfs aus dem Glykogenspeicher entnommen wird, wie in diesem steady state Versuch an der isolierten Cornea, da in der vorliegenden Arbeit die Glykogenreserve nicht angetastet wird, ja sich noch erhöht in den ersten 8 Std. Auf Grund der eingehaltenen Versuchsbedingungen kann es als sicher gelten, daß ein unversehrter Epithelverband vorliegt und damit eine Voraussetzung für einen konstanten Glykogenspiegel gewährleistet ist. Denn wir wissen, daß auch das geringste Trauma des Hornhautepithels zu einer Glykogenmobilisierung führt (Thoft und Friend 1975). Diese Experimente, denen ein mittlerer Glykogengehalt der Kaninchencornea von 239 µMol/g Trockengewicht zugrunde gelegt wird, weisen nach, daß schon die Beeinträchtigung der obersten Epithelzellschicht durch leichtes Reiben mit einem feuchten Wattebausch einen Abfall des Glykogens

und des ATP's auf 70% des Normalwertes innerhalb 30 Min. zur Folge hat. Diese Reduzierung des Glykogen- und ATP-bestandes wird von einem deutlichen Corneaödem begleitet. Die Entwicklung eines Corneaödems durch unzureichende Sauerstoffversorgung z.B. unter harten Kontaktlinsen ist seit der Arbeit von Smelser und Ozeanics sowie Uniacke und Hill bekannt. Sogar sauerstoffdurchlässige weiche Silikonlinsen bedingen einen Abfall des Glykogenspiegels um 20%, ATP-verlust und Ödem (Hill, Augsburger und Uniacke; Thoft und Friend). Diese Ergebnisse liegen in Übereinstimmung mit der Erkenntnis, daß ein geringes Trauma allein zu dieser Reaktion der Hornhaut führen kann. Somit scheinen daher die bis zu 15 Std. konstanten Adenosinphosphatkonzentrationen bei einem bis 50 Std. nur unwesentlich abfallenden Glykogenspiegel verständlich, solange eine ausreichende Sauerstoffversorgung durch gute Belüftung der feuchten Kammer sicher gestellt ist.

Die ermittelten Glykogenwerte von Reim, Förster und Cattepoel sind nicht nur mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar wegen der ebenfalls verwendeten Rinderaugen, sondern auch wegen der gleichen Lagerungsbedingungen. Während Reim von einem Glykogengehalt des Corneaepithels von 80 µMol/g Frischgew. zur Zeit t_o d.h. sofort nach Enukleation der Bulbi ausgeht, beträgt der hier gefundene Wert bei t_o 65,15 µMol/g Frischgew. Die vorliegenden Ergebnisse decken sich in sofern mit den Aussagen von Reim, als bei Messung des Glykogengehalts nach 5 Std. und 28 Std. Lagerung gleiche Werte festzustellen sind. Eine eventuelle Schwankung des Glykogenspiegels zwischen den Meßpunkten 5 Std. und 28 Std. nach Versuchsbeginn kann bei Reim nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die oben angeführte Arbeit von Reim, Förster und Cattepoel bestätigt, daß bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer gelagerten Spenderaugen ein kontrollierter Stoffwechsel in der Hornhaut für die Dauer von 15 bis 20 Std. nach Tod

oder Enukleaton möglich ist. Wesentlich ist vor allem für die Aufrechterhaltung des aeroben Stoffwechsels der Cornea eine ausreichende Ventilierung des Behälters, da in früheren Arbeiten bewiesen wurde, daß die Cornea unabhängig von der Blutversorgung durch die Limbusgefäße ist und zur Energieversorgung von der Glukosezufuhr durch das Kammerwasser abhängt.

Folglich wurden bei Lagerungsversuchen in sauerstoffreier Atmosphäre durch N_2-Begasung die Glykogenreserven erschöpft (Reim, Cattepoel).

In dieser Arbeit ist zu diskutieren, ob die statistisch signifikante Glykogenvermehrung, deren Gipfel zeitlich mit dem Glukosesturz in Kammerwasser und Epithel korreliert, bei Lagerung bis zu 28 Std. unter O_2 Zufuhr biochemisch und physiologisch möglich ist.

Iphraim (1975), der den Glykogenstoffwechsel samt seiner metabolisierenden Enzyme im Gehirn erforschte, fand heraus, daß physikalische und chemische Noxen als Stimulus oder als Folge einer direkten oder indirekten Zellschädigung, wie sie z.B. ionisierende Strahlen, verschiedene Hypoxieformen und mechanische Traumen verursachen, eine reversible Glykogenvermehrung bedingen. Offensichtlich wird der Glykogenspiegel in den Hirnarealen angehoben, die besonders empfindlich auf Noxen reagieren, so daß das Glykogen hier als zusätzlicher Schutzmechanismus angesehen werden kann. Es konnte festgestellt werden, daß die Glykogenerhöhung bei geringer Schädigung reversibel ist. Die Enzymaktivitäten der Phosphorylase und Glykogensynthetase weisen parallel ebenfalls eine Steigerung auf. Iphrahim ist der Auffassung, daß diese Anhebung des Glykogenspiegels auf einer verminderten Glukoseutilisation basiert, hervorgerufen durch Hemmung des anaeroben Stoffwechsels mit oder ohne Hemmung des aeroben. Jede begleitende Hyperglykämie wird mit dazu beitragen, eine gestei-

gerte Glykogensynthese zu induzieren. Eine Zunahme der Glykogensynthetaseaktivität bedingt Neoglykogenese und wird direkt durch einen erhöhten Glukose-6-phosphatspiegel induziert. Dabei ist auf Reim und Ashauer (1975) zu verweisen, die bei Lagerungsversuchen von frisch abradierten Rinderhornhäuten einen temporären Glukose-6-phosphatanstieg fanden, der bis 36 Std. anhielt. Weiter kann eine Akkumulation von Milchsäure mit seiner Verschiebung des intrazellularen pH's zum Sauren direkt eine Glykogensynthese stimulieren (Hassid et al. 1951). Um zu entscheiden, ob diese Verhältnisse ,nämlich Glykogensteigerung als Schutzmechanismus ,auf die Hornhaut des enukleierten gelagerten Auges übertragbar sind, müßten weitere Untersuchungen über den Glykogenenzymkomplex angeschloßen werden.

Die vorliegende Arbeit bestätigt jedoch, daß bei den hier angewandten Lagerungsbedingungen der Glykogenspeicher nicht wesentlich zur Aufrechterhaltung des Corneastoffwechsels herangezogen wird. Es scheint auch von Bedeutung zu sein, daß der Gipfel der Glykogensteigerung im Hornhautepithel nach 8 Std. zeitlich mit dem Glukosesturz aus Kammerwasser und Epithel korreliert.

Man kann sich der Meinung von Reim anschließen, daß andere Energiequellen als Glykogen bzw. Glukose vorliegen müssen, um die gefundenen hohen Energiepotentiale der ATP/ADP-verhältnisse zu erklären. Tamura (1968) fand heraus, daß bei Lagerung ganzer Bulbi die Laktatkonzentration in der Hornhaut höher war, als in der isolierten Cornea, und nahm an, daß der größte Teil aus den tief liegenden Augengeweben wie Linse und Iris stammt, die dem anaeroben Stoffwechsel unterworfen ihr Laktat ins Kammerwasser abgeben. Nach Lowther und Hill (1974) liegt auch die Laktatdehydrogenase im Epithel in hoher Konzentration vor und es spricht dafür, daß das Laktat als Substrat für den energieliefernden Stoffwechsel in Gegenwart von Sauerstoff zu Pyruvat oxidiert wird und weiter in den Zitronensäurezyklus eintritt.

Zusammenfassung

Untersucht wurden an Hand von Rinderaugen folgende Metabolitspiegel: im Epithel Glukose, Fruktose und Glykogen und im Kammerwasser Glukose und Fruktose.

Die Lagerungsbedingungen in einer belüfteten feuchten Kammer sind mit der Konservierung menschlicher Spenderhornhäute identisch. Die Versuchsreihen abhängig von der Lagerungszeit liefen vom Zeitpunkt der Enukleation bis 48 Stunden.

Folgende Erkenntnisse wurden gewonnen:

1. Glukose

Der Glukosegehalt des Kammerwasser beträgt mit 3,256 µMol/gH_2O genau 1,85 mal soviel wie der Glukosespiegel des Epithels. Nach 12 Std. Lagerungszeit findet im Kammerwasser ein starker Abfall des Metabolitspiegels auf nur 2,7% statt, um dann nach 48 Std. die Grenze der Nachweisbarkeit zu erreichen. Der Glukosespiegel im Epithel fällt kontinuierlich auf 19% des Ausgangswertes nach 48 Std. ab und zeigt sogar bei 24 und 30 Std. Lagerung wieder einen kurzfristigen Anstieg.

2. Fruktose

Der im menschlichen und tierischen Geweben so selten vorkommende Ketozucker Fruktose findet sich im Corneaepithel mit 0,732 µMol/g Feuchtgewicht in erstaunlich hoher Menge, während im Kammerwasser nur Spuren von Fruktose in der Größenordnung von 0,093 µMol/gH_2O gemessen wurden. Bis auf einen kurzfristigen Anstieg bei 2 Std. bleibt der Fruktosespiegel im Corneaepithel bis 8 Std. Lagerung fast konstant, um dann langsam abzusinken und nach 48 Std. Lagerung sein tiefstes Niveau zu erreichen. Im Kammerwasser zeigen sich trotz des extrem niedrigen Spiegels nur unwesentliche Schwankungen. So werden nach 48 Std. noch immer 41% des Ausgangswertes gemessen.

3. Glykogen

Der Glykogengehalt des Corneaepithels beträgt zur Zeit der Enukleation 65,175 µMol/g Frischgewicht gemessen in Glukosemolekülen. Statt des erwarteten Metabolitabfalls bei Lagerung findet ein Anstieg des Glykogens auf 170% in den ersten 8 Std. statt. Nach 30 Std. beträgt der Glykogenspeicher immer noch 80% des Ausgangswertes.

Der fallende Glukosespiegel im Hornhautepithel wird als Zeichen einer gesteigerten Glukoseutilisation gewertet, da die Cornea, um Transparenz und Dehydrationszustand zu erhalten, mit Hilfe des aeroben Stoffwechsels aktive Leistung vollbringen muß. Auch der Sturz der Glukosekonzentration im Kammerwasser deutet auf diesen vermehrten Energiebedarf in den ersten 12 Stunden der Lagerung, bis sich wieder ein Metabolit-Gleichgewicht einstellt. Der erstaunlich hohe Fruktosegehalt im Corneaepithel läßt an einen eigenen Fruktosestoffwechsel denken, wie es über den Sorbitolweg durch Bildung freier Fruktose aus Glukose möglich ist. Während im Kammerwasser bis 48 Std. ein geringer aber fast konstanter Fruktosespiegel aufrechterhalten wird, macht das langsame Absinken der Fruktose im Corneaepithel eine Beteiligung an der Energieversorgung wahrscheinlich. Von Interesse ist vor allem das Verhalten der Glykogenspeicher, da in der vorliegenden Arbeit gegensätzlich zur Literaturmeinung die Kohlenhydratreserve kaum angetastet wird. So kann dem Glykogen eine strukturelle Bedeutung für Lebensfähigkeit und Gesundheit der Hornhaut zugeschrieben werden.

An Hand der untersuchten Metabolitspiegel und des Trübungsverlaufs der Cornea muß bestätigt werden, daß bei den eingehaltenen Lagerungsbedingungen ganzer Bulbi bis zu 30 Std. nach Enukleation ein kontrollierter Stoffwechsel möglich ist.

Diese Erkenntnis ist für die Konservierung und Transplantation menschlicher Spenderhornhäute von größter Bedeutung.

F. Literaturverzeichnis

APPLEMENT, M.M., KREBS, E.G. und FISCHER, E.H.:
Purification and properties of inactive liver phosphorylase.
Biochemistry Wash. 5, 2101-2107 (1966).

AONO, H.:
Elektron microscopical studies on the cornea.
Fol. Ophthal. jap. 12 , 331-337 (1961a).
In: ROHEN, Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen III/4, (1964).

BARBER, G.W.:
Physiological chemistry of the eye.
Arch. Ophthal. 87 , 74 (1972).

BEAL, J.M. und SMITH, J.L.:
The metabolism of fructose in man.
Surgery, St. Louis 36 , 243 - 255 (1954).

BERNT, E. und BERGMEYER, H.K.:
In: Methoden der enzymatischen Analyse.
2. Aufl., Bd. I und II, Verlag Chemie Weinheim, Bergstrasse (1970).

BUSACCA, A:
In: Biomicroscopie et histopathologie de l'oil.
Schw. Druck, Zürich (1952).

CALMETTES, L., DEODATI, F., PLANEL, H. und BEC, P. :
Étude histologique et histochemique de l'epithélium antérieur de le cornée et de ses basales.
Arch. Ophthal. Paris 16, 481-491 (1956).

CHILDRESS, C.C., SACKTOR, B., GROSSMAN, J.W. und BUILDING,E.:
Isolation, ultrastructur and biochemical characterization of glycogen in insect flight muscle.
J. Cell Biol. 45 , 83-90 (1970).

CHYLACK, L.T.:
Control of glycolysis in the lens.
Exp. Eye Res. 11 , 280-293 (1971).

CORI, G.T. und CORI, C.F.:
Crystalline muscle phosphorylase IV.
Formation of glycogen.
J. biol. Chem. 151 , 57-63 (1943).

DAVSON, H.:
The hydration of the cornea.
Biochem. J. 59 , 24 (1955).

DROCHMANS, P. und DANTAN, E.:
Size distributions of liver glycogen particles.
In: Control of glycogen metabolism, W.J. Wheland (Ed.), London-New York: Academic Press, 187-201 (1968).

ENGELKING, E. und LEYDHECKER, W.:
Grundriss der Augenheilkunde.
16. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1972).

FRIEDE, R.L.:
Tophographic brain chemistry.
New York: Academic Press, 132-157 (1966).

FÖRSTER, K.H.:
Über die Verteilung der Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels in der Rindercornea unter besonderer Berücksichtigung der Substantia propria.
Inaugural-Dissertation, Marburg/L. (1969).

GABBAY, K.H.:
The sorbitol pathway and the complications of diabetes.
In: The New England Journal of Medicine Vol 288 , No. 16, 831-836 (1973).

GABBAY, K.H. und O'SULLIVAN, J.B.:
The sorbitol pathway : enzyme localization and content in normal and diabetic nerve and cord.
Diabetes, New York 17 , 239-243 (1968).

GABBAY, K.H., MEROLA, L.O. und FIELD, R.A.:
The sorbitol pathway : presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes.
Science 151 , 209-210 (1966).

GABRIEL, K.H.:
A procedure for testing the homogenity of all sets of means in analysis of variance.
Biometrics 20 , 458 - 477 (1964).

HALE, P.N. und MAURICE, D.M.:
Sugar transport across the corneal endothelium.
Exp. Eye Res. 8 , 205-215 (1969).

HANNA, C. und O'BRIAN, J.E.:
Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea.
Arch. Ophthal., New York 64 , 536 (1960).

HARRIS, J.E. und NORDQUIST, L.T.:
The hydration of the cornea I.
The transport of water from the cornea.
Am. J. Ophthal. 40 , 100-109 (1955).

HASSID, W.Z., DOUDOROFF, M. und BARKER, H.A.:
Phosphorylase-phosphorolysis and synthesis of saccarides.
In: The enzymes (Part 2),Sumner, F.B. and Myrback, K. (Eds.),
New York: Academic Press (1951).

HEDBYS, B.O., MISHIMA, S. und MAURICE, D.M.:
The imbibition pressure of the corneal stroma.
Exp. Eye Res. 2 , 99-111 (1963).

HERS, H.G.:
The mechanism of the formation of seminal and fetal fructose.
Biochem. Biophys. Acta 37 , 127-128 (1960).

HERS, H.G.:
Le mécanisme de la transformation de glucose en fructose par les vésicules seminales.
Biochim. Biophys. Acta 22 , 201-203 (1956).

HERS, H.G.:
Le metabolisme du fructose.
Edition Arsica, Brüssel (1957).

HILL, R.M., AUGSBURGER, A.R. und UNIACKE, C.A.:
Oxygen permeable "hard" contact lenses.
Contact Lens 3 , 40 (1972).

HILL, R.M. und FATT, I.:
Oxygen uptake from a limited reservoir by human cornea in vivo.
Science 142 , 1295 (1963).

HOCKWIN, O.:
The presence of glycogen in lenses of different species.
Exp. Eye Res. 15 , 235-244 (1973).

HODSON, S.:
Macromolecular synthesis in corneal endothelium.
Exp. Eye Res. 11 , 15 (1971).

HUBBARD, R.S. und RUSSEL, N.M.:
The fructose content of spinal fluid.
J. Biol. Chem. 119 , 647-661 (1937).

IBRAHIM, M.Z.M.:
Glycogen and its related enzymes of metabolism in the central nervous system.
In: Advances in anatomy, embryology and cell Biology,
Brodal, A., Hild, W., van Limborgh, J., Ortmann, R., Schiebler, T.H., Töndury, G. und Wolff, E. (Eds.),
52,1, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1975).

IBRAHIM, M.Z.M., ATLAN, H., MIQUEL, J. und CASTELLANI, P.:
Synthetic and hydrolytic enzymes of glycogen in the normal and the irradiated rat brain.
Radiat. Res. 43 , 341-355 (1970a).

IBRAHIM, M.Z.M., MIQUEL, J. und HAYMAKER, W.:
Glycogen and phosphorylase activity in rat brain

during recovery from several forms of hypoxia.
Amer. J. Pathol. 60 , 403-420 (1970b).

JAKUS, M.A.:
The fine structure of the human cornea.
In: The structure of the eye.
P. 334, Smelser, G.K. (Ed.), London New York:
Academic Press (1961).

JAKUS, M.A.:
Ocular fine tissue.
Little, Brown and Co. (Eds.), Boston (1964).

KAYE, G.J.:
Stereologie measurement of cell volume fraction
of rabbit corneal stroma.
Arch. Ophthal. 82 , 792-794 (1969).

KINOSHITA, J.H., MASUPAT, T. und HELPANT, M.:
Pathways of glucose metabolism in corneal
epithelium.
Science 122 , 72-73 (1955).

KINOSHITA, J.H. und MASURAT, T.:
The direct oxidative carbohydrate cycle of
bovine corneal epithelium.
Arch. Biochem. Biophys. 53 , 9 (1954).

KINSEY, V.E., WACHTL, C., KUCK, J.F.R., jr. und REDDY, D.V.N.:
Current research on the culture of lenses.
Acta 18 th Conc. Ophthal., Belgium 1958,
Vol 1 , 865-872 (1959).

KUCK, J.F.R.:
The formation of fructose in ocular lens.
Arch. Ophthal., Chicago 65 , 840-846 (1961).

KUCK, J.F.R. und CROSSWELL, H.H.:
Lens as the chief source of fructose in rabbit aqueous humour.
Ophthal. Res. 6 , 189-196 (1974).

KUHLMAN, R.E. und RESNIK, R.A.
The oxydation of C^{14} labeled glucose and lactate by the rabbit cornea.
Arch. Biochem. Biophys. 85 , 29-36 (1959).

LANGHAM, M.E.:
Utilisation of oxygen by the component layers of the living cornea.
J. Physiol. 117 , 461 (1952),

LAZAROW, A.:
Particulate glycogen: A submicroscopic component of the guinea pig liver cell, its significance in glycogen storage and the regulation of blood sugar.
Anat. Rec. 84 , 31-50 (1942).

LESKE, R., MAYERSBACH, H.V.:
The role of histochemical and biochemical preparation methods for the detection of glycogen.
J. Histochem. Cytochem. 17 , 527-538 (1969).

LEUTHARD, F. und STUHLFAUTH, K.:
Biochemische, physiologische und klinische Probleme des Fruktosestoffwechsels.
In: Medizinische Grundlagenforschung Bd. III, 439, Stuttgart (1960).

LEVINE, R. und HUDDLESTON, B.:
The comparative action of insulin on the disposal of intravenous fructose and glucose.
Fed. Proc. 6 , 151 (1941).

LOWTHER, G.E. und HILL, R.M.:
Corneal epithelium recovery from anoxia.
Arch. Ophthal. 92 , 231-234 (1974).

MAURICE, D.M.:
Nutritional aspects of corneal grafts and protheses corneo-plastic surgery.
Proceedings of the second international corneo-plastic conference, London (1967),

PEDLER, C.:
The fine structure of the corneal epithelium.
Exp. Eye Res. 1 , 286 (1962).

PLETSCHER, A., FAHRLÄNDER, H. und STAUB, H.:
Fruktoseumsatz bei Gesunden, Diabetikern und Leberkranken.
Helvet. physiol. pharmacol. Acta 9 , 46 (1951).

POLSE, K.A. und MANDELL, R.B.:
Critical oxygen tension at the corneal surface.
Arch. Ophthal. 84 , 505 (1970).

RABAEY, N.:
In: Nature 198 , 206 London (1963).

RAPOPORT, S.M.:
Medizinische Biochemie
Verlag Volk und Gesundheit Berlin (1969).

REDDY, V.N., CHAKRAPANI, B. und STEEN, D.:
Sorbitol pathway in the ciliary body in relation to accumulation of amino acids in the aqueous humour of alloxan-diabetic rabbits.
Invest. Ophthal. 10 , 870-875 (1971).

REDSLOB, E.:
Le développement de la cornée.
Arch. Anat. Histol. Embryol. 19 , 137 (1935).

REIM, M.:
Warum ist die Hornhaut durchsichtig?
Ber. über die 71. Zusammenkunft der ophthalmol. Gesellschaft in Heidelberg (1971).

REIM, M. und ASHAUER, D.:
The gluthatione of the cornea.
Arch. Ophthal. Paris 35 , 153-158 (1975).

REIM, M., BOECK, H., KRUG, A. und VENSKE, G.:
Aqueous humour and cornea stroma metabolite levels under various conditions.
Ophthal. Res. 3 , 241-250 (1972).

REIM, M., CATTEPOEL, H., BITTMANN, K. und KILP, H.:
Methodische und physiologische Aspekte bei der statistischen Auswertung von Metabolitspiegeln in verschiedenen Kompartimenten der vorderen Augenabschnitte.
A. v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 177 , 355-368 (1969).

REIM, M., FÖRSTER, K.H. und CATTEPOEL, H.:
Some criteria of the metabolism in the donor cornea.
Proc. XXI. Int. Congr. Ophthal. Mexico 1970
Exerpta Medica Amsterdam, 728-733 (1971).

REIM, M., LAX, F., LICHTE, H. und TURSS, R.:
Steady state levels of glucose in the different layers of the cornea, aquous humour, blood and tears in vivo.
Ophthalmologica Basel 154 , 39-50 (1967).

REIM, M. und LICHTE, H.:
Beziehung zwischen Energiestoffwechsel und Hornhauttrübung.
A. v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 168 , 365-377 (1965).

REIM, M. und MEYER, D.:
Über Veränderungen von Metabolitgehalten im Corneaepithel in Anaerobiose.
A. v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 174 , 103-109 (1968).

REIM, M., SCHÜTTE, E. und CATTEPOEL, H.:
Experimentelle Variation der Spiegel einiger Metabolite in der Cornea.
71. Ber. Dtsch. Ophthal. Ges., W. Jaeger und J.F. Bergmann, (Eds.), 84-87, München (1972).

REIM, M. und TURSS, R.:
Über Metabolitspiegel im Cornea-Endothel und Kammerwasser bei Rindern.
A. v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 176 , 252-262 (1968).

REVEL , J.P.:
Electron microscopy of glycogen.
J. Histochem. Cytochem. 12 , 104-114 (1964).

RILEY, M.V.:
Glucose and oxygen utilisation by the rabbit cornea.
Exp. Eye Res. 8 , 193-200 (1969).

RILEY, M.V.:
Aerobic glycolysis in the ox cornea.
Exp. Eye Res. 8 , 201-204 (1969).

ROHEN, J.W.:
Das Auge und seine Hilfsorgane. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.
Bd. III, 4. Teil, Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York (1964).

ROTTENBERG, D.A., PASSONNEAU, J.V. und LUST, W.D.:
Glycogen mediated activation of pig-brain glycogen synthetase I and D.
Biochem. Biophys. Commun. 48 , 1192-1198 (1964).

RYCROFT, B.W.:
Corneal Grafts.
Butterworth (Ed.), London (1955).

SCHÜTTE, E.:
Metabolitspiegel im Kammerwasser und in der Cornea nach Zyklodiathermie und lokaler Vereisung des Ciliarkörpers sowie nach Auffüllung der Vorderkammer mit Silikonoel.
Inaugural-Dissertation Marburg/L. (1971).

SCHÜTTE, E. und REIM, M.:
Metabolite und Hydratation der Kaninchenhornhaut.
A. v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 187 , 131-136 (1973).

SELINGER, Z. und SCHRAMM, M.:
An insoluble complex formed by the interaction of muscle phosphorylase with glycogen.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 12 , 208-214 (1963).

SHANTHAVEERAPPA, T.R., WAITZMAN, M.B. und BOURNE, G.H.:
Studies on the distribution of phosphorylase in eyes of rabbits and the squirrel monkey.
Histochemie 7 , 80-95 (1966).

SHIMIZU, N.A. und KUMAMOTO, T.:
Histochemical studies on the glycogen of the mammalian brain.
Anat. Rec. 114 , 479-497 (1952).

SHIMIZU, N.A. und MAEDA, S.:
Histochemical studies on glycogen of the retina.
Anat. Rec. 116 , 427-437 (1953).

SMELSER, G.K. und CHEN, O.K.:
Physiological changes in cornea induced by contact lenses.
Arch. Ophthal. 53 , 676 (1955).

SMELSER, G.K. und OZEANICS, V.:
Structural changes in corneas of ginua pigs after wearing contact lenses.
Arch. Ophthal. 49 , 335 (1953).

SMELSER, G.K. und OZEANICS, V.:
Importance of atmospheric oxygen for maintenance of the optical properties of the human cornea.
Science 115 , 140 (1952).

SIE , H.G., SAWYER, D. und FISHMAN, W.H.:
In: Nature 201 , 393-394, London (1964).
In: J. Histochem. Cytochem. 14 , 247-253 (1966).

SÖLLNER, F. und HOCKWIN, O.:
Über den Gehalt frischer und konservierter Hornhäute an säurelöslichen Phosphatidverbindungen (Nukleotide).
A. v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 167 , 467, (1964).

STAUBESAND, J.:
Zum Feinbau des Corneaendothels.
Verh. Anat. Ges. 57 , Verlg. Hamburg (1961 b),
Erg. Bd. Anat. Anz. III, 394 (1962).

STAUBESAND, J.:
Pinocytose und Permeabilität markiert durch Gold- und Fe III Sole.
Verh. Anat. Ges. 57 , Verlg. Hamburg, Anat. Anz. Suppl. III, 393 (1962 b).

STEINER, D., YOUNGER, L. und KING, J.:
Purification and properties of uridine diphosphat glucose-glycogen glucosyltransferase from rat liver.
Biochemistry, Wash. 4 , 740-751 (1965).

STEWARD, M.A. und PASSONNEAU, J.V.:
Identification of fructose in mammalian nerve.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 17 , 536-541 (1964).

STETTEN, D. Jr. und STETTEN, M.R.:
Glycogen metabolism.
Physiol. Rev. 40 , 505-537 (1967).

STUHLFAUTH, K. und PROSIEGEL, R.:
Über Intermediarprozesse im Kohlenhydrathaushalt nach intravenöser Laevulosebelastung bei Gesunden, Diabetikern und Fettsüchtigen.
Klin. Wschr. 29 , 213 (1951).

SUTHERLAND, E.W. und WOSILAIT, W.D.
The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase.
J. Biol. Chem. 218 , 459-468 (1956).

SÜLLMANN, H.:
Arch. Augenheilk. 110 , 303 (1937).

TAKAHASHI, G.H. und FATT, I.:
The diffusion of oxygen in the cornea.
Exp. Eye Res. 4 , 4 (1965).

TAMURA, H.:
Studies on the lactate metabolism under various conditions.
Acta Soc. Ophthal. 72 , Report II, 497-504, Tokyo (1968).

THOFT, R.A. und FRIEND, J.:
Corneal epithelial glucose utilisation.
Arch. Ophthal. 88 , 58-62 (1972).

THOFT, R.A. und FRIEND, J.:
Biochemical aspects of contact lens wear.
Amer. J. Ophthal. 86 , 685-691 (1975).

TURSS, R., FRIEND, J. und DOHLMAN, C.H.:
Effect of a corneal fluid barrier on the nutrition of the epithelium.
Exp. Eye Res. 9 , 254-259 (1970).

UNIACKE, C.A. und HILL, R.M.:
The depletion course of epithelial glycogen with corneal anoxia.
Arch. Ophthal. 87 , (1972).

UNIACKE, C.A., HILL, R.M., GREENBERG, M. und SEWARD, S.:
Physiological tests for new contact lens materials.
Amer. J. Ophthal. 49 , 329 (1972).

WANSON, J.C. und DROCHMANS, P.:
Rabbit sceletal muscle glycogen.
A morphological and biochemical study of glycogen ß-particles isolated by the preceptitation - centrifugation method.
J. Cell Biol. 38 , 130-150 (1968).

WASSILEWA, P., HOCKWIN, O. und KORTE, L.:
Glycogen concentration changes in retina, vitreous body and other eye tissue caused by disturbances of blood circulation.
A. v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 199 , 115-120 (1976).

ANHANG

Epithel Nr.	Lagerungs-zeit	Glukose	Fruktose	Glykogen
1	0 Std.	1,90286	0,66155	63,5162
2	0 Std.	1,19719	0,88836	72,2160
3	0 Std.	1,14465	0,71038	55,9811
4	0 Std.	1,19687	0,54922	63,2776
5	0 Std.	1,02178	0,31537	51,2023
6	0 Std.	2,41200	1,11015	73,6264
7	0 Std.	1,35325	0,70206	98,9097
8	0 Std.	2,11906	1,09449	72,9265
9	0 Std.	1,39514	0,57522	26,0402
10	0 Std.	3,81512	0,72019	73,9262

Tab. 8 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose, Fruktose und Glykogen im Epithel der Rindercornea in µMol/g Feuchtgewicht.

Epithel Nr.	Lagerungs-zeit	Glukose	Fruktose	Glykogen
1	2 Std.	1,25059	0,50723	81,0563
2	2 Std.	2,02656	1,18700	63,3178
3	2 Std.	1,63683	0,68946	45,2745
4	2 Std.	1,81214	1,49195	88,0355
5	2 Std.	1,69623	1,22746	88,1585
6	2 Std.	1,56038	0,74034	53,2915
7	2 Std.	1,34873	0,85432	64,0434
8	2 Std.	0,69216	0,46416	54,7119
9	2 Std.	1,36890	1,04809	70,4164
10	2 Std.	1,47517	1,33647	66,5984

Tab. 9 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose, Fruktose und Glykogen im Epithel der Rindercornea in µMol/g Feuchtgewicht.

Epithel Nr.	Lagerungs-zeit	Glukose	Fruktose	Glykogen
1	4 Std.	0,48498	0,38043	79,7928
2	4 Std.	0,79282	0,57736	80,7433
3	4 Std.	0,73070	0,74716	72,7050
4	4 Std.	0,46236	0,42739	83,4671
5	4 Std.	0,44890	0,31553	75,6160
6	4 Std.	1,05835	1,22917	78,8787
7	4 Std.	1,11199	0,92241	85,0951
8	4 Std.	1,29299	0,75927	80,5455
9	4 Std.	0,85281	0,66611	70,5277
10	4 Std.	0,89316	0,84207	57,1334

Tab. 10 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose, Fruktose und Glykogen im Epithel der Rindercornea in µMol/g Feuchtgewicht.

Epithel Nr.	Lagerungs-zeit	Glukose	Fruktose	Glykogen
1	6 Std.	0,73069	0,58071	135,3106
2	6 Std.	1,67960	0,47230	64,4064
3	6 Std.	1,18419	1,07819	100,7605
4	6 Std.	2,62662	1,09693	51,3793
5	6 Std.	0,86345	0,54192	100,3858
6	6 Std.	0,99347	0,78151	100,9121
7	6 Std.	0,51349	0,68833	80,8286
8	6 Std.	0,42692	0,64618	77,0270
9	6 Std.	0,38501	0,59794	73,1847
10	6 Std.	0,43492	0,70805	58,6917

Tab. 11 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose, Fruktose und Glykogen im Epithel der Rindercornea in µMol/g Feuchtgewicht.

Epithel Nr.	Lagerungs-zeit	Glukose	Fruktose	Glykogen
1	8 Std.	0,65597	0,90186	135,8025
2	8 Std.	0,71978	0,49073	155,2100
3	8 Std.	0,80060	0,46876	126,3317
4	8 Std.	0,62874	0,51105	91,1671
5	8 Std.	1,19768	0,88605	89,3178
6	8 Std.	0,53955	0,80335	107,5963
7	8 Std.	1,33168	0,86437	76,8401
8	8 Std.	0,44391	0,64780	114,0490
9	8 Std.	0,45791	0,70152	86,5136
10	8 Std.	0,82714	0,72837	126,5453

Tab. 12 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose, Fruktose und Glykogen im Epithel der Rindercornea in µMol/g Feuchtgewicht.

Epithel Nr.	Lagerungs-zeit	Glukose	Fruktose	Glykogen
1	12 Std.	0,44303	0,16875	77,8479
2	12 Std.	0,24130	0,29450	94,6139
3	12 Std.	0,34698	0,19928	98,0498
4	12 Std.	0,33060	0,40299	85,9320
5	12 Std.	0,59734	0,59835	76,8274
6	12 Std.	0,47405	0,14135	82,8240
7	12 Std.	0,46038	0,39723	140,4698
8	12 Std.	0,50254	0,57655	84,2027
9	12 Std.	0,22404	0,34577	100,9589
10	12 Std.	0,30499	0,20214	121,7982

Tab. 13 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose, Fruktose und Glykogen im Epithel der Rindercornea in µMol/g Feuchtgewicht.

Epithel Nr.	Lagerungs-zeit	Glukose	Fruktose	Glykogen
1	24 Std.	0,60650	0,24101	73,3587
2	24 Std.	0,60900	0,18040	105,6750
3	24 Std.	0,83800	0,26800	86,1370
4	24 Std.	2,12250	0,32700	75,1229
5	24 Std.	1,80000	0,43350	93,6436
6	24 Std.	0,90250	0,24600	89,9849
7	24 Std.	0,25100	0,15995	95,7561
8	24 Std.	1,28800	0,47200	69,4388
9	24 Std.	1,63500	0,37200	66,9388
10	24 Std.	0,25500	0,16700	65,0227

Tab. 14 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose, Fruktose und Glykogen im Epithel der Rindercornea in µMol/g Feuchtgewicht.

Epithel Nr.	Lagerungs-zeit	Glukose	Fruktose	Glykogen
1	30 Std.	2,45200	0,34320	50,5136
2	30 Std.	2,02930	0,71262	63,5328
3	30 Std.	2,13050	0,50311	51,9232
4	30 Std.	0,80018	0,31187	46,8531
5	30 Std.	0,79886	0,24836	52,6310
6	30 Std.	0,84140	0,50801	54,9130
7	30 Std.	1,73365	0,40095	64,1759
8	30 Std.	0,21875	0,05367	67,0413
9	30 Std.	0,42636	0,06896	46,0603
10	30 Std.	0,20323	0,09837	45,9751

Tab. 15 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose, Fruktose und Glykogen im Epithel der Rindercornea in µMol/g Feuchtgewicht.

Epithel Nr.	Lagerungs-zeit	Glukose	Fruktose	Glykogen
1	48 Std.	0,38316	0,13223	105,5270
2	48 Std.	0,36679	0,09458	43,7022
3	48 Std.	0,33898	0,05094	46,6889
4	48 Std.	0,38821	0,05418	85,0797
5	48 Std.	0,26210	0,02246	58,2242
6	48 Std.	0,32092	0,06353	67,8851
7	48 Std.	0,55681	0,15492	77,8712
8	48 Std.	0,43504	0,14134	74,1695
9	48 Std.	0,16522	0,05765	68,7222
10	48 Std.	0,21754	0,06912	87,3532

Tab. 16 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose, Fruktose und Glykogen im Epithel der Rindercornea in µMol/g Feuchtgewicht.

Kammerwasser-Nr.	Lagerungszeit	Glukose	Fruktose
1	0 Std.	2,91789	0,09622
2	0 Std.	3,59492	0,08946
3	2 Std.	2,38503	0,11024
4	2 Std.	2,01544	0,10469
5	4 Std.	2,35468	0,11849
6	4 Std.	1,40431	0,11172
7	6 Std.	0,30294	0,10147
8	6 Std.	0,30563	0,10617
9	8 Std.	0,30916	0,16478
10	8 Std.	0,58024	0,06446
11	12 Std.	0,00599	0,06551
12	12 Std.	0,01182	0,11673
13	24 Std.	0,01237	0,07619
14	24 Std.	0,00572	0,05606
15	30 Std.	0,00273	0,07142
16	30 Std.	0,00464	0,06556
17	48 Std.	0,00281	0,03404
18	48 Std.	0,00063	0,04272

Tab. 17 Einzelwerte des Gehaltes an Glukose und Fruktose im Kammerwasser des Rinderauges in µMol/g H_2O

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Würzburg:

Altmann, Bannasch, Bauereisen, Fasold, Helmreich, Heran, Hink, Krause, Kremling, Kuschke, Lang, Lich, Mueller, Naujoks, Roedig, Schiebler, Schmidt, Seelinger, Simonis, Wüstenfeld, Wullstein,

in Marburg:

Amon, Berendes, Buchholz, Bommer, Dittrich, Eissner, Exner, Ganz, Graul, Hamelman, Hess, Hildebrandt, Hort, Jakob, Joseph, Kaffarnik, Koransky, Korb, Linneweh, Martini, Oehmig, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rohen, Schiff, Schleyer, Schmitz-Moorman, Seidel, Siegert, Straub, Strohmeyer, Thoenes, Voss, Wendt.

Ich danke Herrn Prof. Dr.med. M. Reim für die Übernahme des Referats und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. E. Schütte für die Themenstellung.

Mein Dank gilt ebenso meinem Korreferenten Prof. Dr. med. L. Welge-Lüssen und Herrn Prof. Dr. med. W. Straub, der mir freundlichst den Arbeitsplatz überließ.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik in Aachen für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung.

L e b e n s l a u f

23. 8. 1946	geboren in Jahnsbach/Sachsen als Tochter des damaligen Studienassessors und heutigen Oberstudiendirektors i. R. Gerhard Meiner und seiner Ehefrau Liesbeth, geb. Uhlig.
1953 - 1957	Besuch der Volksschule und
1957 - 1966	des Neusprachlich-naturwissenschaftlich-mathematischen Gymnasiums in Neumünster/ Holstein.
3. 2. 1966	Abitur.
WS 1966/67 - SS 1973	Studium der Medizin an der Universität Würzburg und Marburg.
31. 7. 1973	Staatsexamen.
1973 - 1974	Medizinalassistentenzeit an der Universitäts-Augenklinik Marburg, der Internen Universitäts-Poliklinik Marburg und der chirurgischen Abteilung des Marienhospitals Aachen.
27. 3. 1975	Approbation.
1. 6. 1975 - 1. 7. 1977	Tätigkeit als chirurgische Assistentin im St. Franziskus-Krankenhaus Aachen
15. 7. 1977	Beginn der Facharztausbildung für Augenheilkunde an der Augenklinik der RWTH Aachen.
28. 12. 1977	Eheschließung mit dem Zahnarzt Dr. Peter Kriett.